



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Trabajo de Tesis de
Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos

**“UTILIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN COMBINACIÓN CON
ÁCIDO LÁCTICO PARA EXTENDER LA VIDA ÚTIL DE CARNES
BOVINAS”**

Tesista: Martha Catalina Talero García
Directora: Dra. Leda Giannuzzi
Codirectora: Dra. Fernanda Coll Cárdenas

2019

El presente trabajo de Tesis es para optar al título de Magíster en Tecnología e Higiene de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) bajo la dirección de la Dra. Leda Giannuzzi y Co - dirección de la Dra. Fernanda Coll Cárdenas.

La Plata 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi directora la Dra. Leda Giannuzzi y Co - directora la Dra. Fernanda Coll Cárdenas, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, la paciencia para enseñarme y compartir los conocimientos necesarios en el desarrollo y culminación de este trabajo.

A todos los docentes y miembros de la Maestría en Tecnología e Higiene de los alimentos por sus conocimientos y aportes en mi formación como profesional.

A la facultad de ciencias exactas de la UNLP y al centro de investigación y desarrollo en criotecnología de alimentos CIDCA por facilitarme los equipos y materiales para desarrollar esta tesis.

A Angélica, Carla, Leydy y demás compañeros de maestría y de trabajo en El CEMDDE por todos los momentos compartidos, alegrías y tristezas y por hacer tan amena esta etapa en Argentina.

A mi amiga Jessy por sus cuidados y amistad sincera. A Sebastián L. por darme la oportunidad de abrirme las puertas de su casa y ser parte de mi familia en La Plata.

A mis amigos Matías, Sebastián P, Omar, Caro Ninco, Rocío, Caro Salgado, Leidy Caro, CJP y demás amigos por acompañarme en aquella época maravillosa de estancia en Argentina.

A mis amigas de la Vida Wendy, Adriana, Tiziana, Diana, Alejandra por su comprensión y acompañamiento en todos mis planes y proyectos.

A mis compañeros de trabajo y Jefaturas en Chile por apoyarme y permitir el desarrollo de éste proyecto.

A mi tía Aura Lilia por su apoyo y acompañamiento durante los años de mi residencia en Argentina.

A mi tía Nelly García por su cariño constante y apoyo.

A mi hermana Lina Isabel por ser un ejemplo a seguir, un apoyo incondicional y por ser la mejor compañera de vida. A mi cuñado Mario por su apoyo y presencia constante.

A mi familia, especialmente a mis padres por su amor, oraciones, valiosos consejos, apoyo y por sus enseñanzas de vida.

A mi esposo Camilo por ser mi compañero de viaje, por todo su amor, y por considerar esta meta como propia.

CONTENIDO

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Producción de carne en Argentina.....	10
1.2 Características de la carne como materia prima	10
1.3 Características y composición de la carne bovina.....	11
1.4 Microbiología de la carne.....	12
1.4.1 Flora bacteriana de la carne: Microorganismo alterantes.....	13
1.4.2 Microorganismos patógenos	14
1.5 El color superficial de la carne	21
1.6 Preservación de la carne.....	22
1.6.1 Temperatura	22
1.6.2 Influencia del pH y del ácido láctico como preservador	23
1.6.3 Aceites esenciales: Influencia como agentes antimicrobianos.....	26
1.7 Microbiología predictiva: Modelos matemáticos.....	37
2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	41
2.1 Objetivos:	42
2.1.1 Objetivo general	42
2.1.2 Objetivos específicos.....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.1. Aceites esenciales y ácido láctico	44
3.2. Cepas utilizadas y preparación del inóculo	44
3.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada agente microbiano ..	44
3.3.1 Preparación de los Agentes antimicrobianos.....	44
3.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en forma individual.....	45
3.3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de las mezclas de los diferentes aceites esenciales y mezclas de aceites esenciales con ácido láctico	46
3.3.4 Determinación de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI) y el Índice de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (ICFI).....	47
3.4. Estudios en el músculo cárneo	48
3.4.1. Preparación de las muestras: Adición de antimicrobianos individualmente y en mezclas	48
3.4.2 Análisis microbiológico	49
3.5 Modelado matemático	50

3.6. Determinación de la vida útil de las carnes tratadas con mezclas de antimicrobianos	52
3.7. Análisis sensorial	53
3.7.1 Preparación de las muestras	53
3.7.2 Panel sensorial.....	53
3.8. Análisis Estadístico	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de romero, eugenol y orégano de forma individual sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> spp. y <i>Staphylococcus aureus</i>	56
4.2 Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de aceites esenciales sobre microorganismos de interés alimentario:	59
4.3 Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de aceites esenciales y ácido láctico sobre microorganismos de interés alimentario:	61
4.3.1 Determinación de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI) y el índice de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI).	64
4.4 Estudios en el músculo cárneo	68
4.4.1 Efecto antimicrobiano de aceites esenciales y ácido láctico añadidos de forma individual sobre el músculo cárneo	68
4.4.2 Modelo Matemático	74
4.4.3 Efecto antimicrobiano de mezclas binarias de aceites esenciales y ácido láctico sobre el músculo cárneo.....	79
4.4.4 Comparación del efecto antimicrobiano de aceites esenciales y ácido láctico en forma individual y en mezclas binarias sobre el músculo cárneo.....	89
4.5 Efecto de tratamientos antimicrobianos a base de aceites esenciales y ácido láctico en la conservación del color en el músculo cárneo refrigerado.	92
4.6 Análisis Sensorial.....	102
4.7 Evaluación de vida útil.....	107
5. CONCLUSIONES.....	110
6. BIBLOGRAFÍA	113
7. ANEXOS	134

RESUMEN

El objetivo de ésta tesis de maestría fue evaluar la aplicación de tres aceites esenciales como antimicrobianos naturales, tales como romero, orégano y eugenol conjuntamente con ácido láctico y su aplicación en carnes bovinas refrigeradas. Inicialmente, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada aceite en forma individual y en mezclas con el ácido láctico utilizando cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. La CMI de romero, eugenol y orégano, se encontró en rangos de 0,12 - 0,25% V/V. Para las mezclas romero - eugenol, orégano - eugenol y orégano - romero, los valores de CMI abarcaron un rango de 0,03 - 0,06 % V/V. Posteriormente, se preparó ácido láctico al 0,87%V/V con el objeto de evaluar su efecto antimicrobiano con las distintas concentraciones de aceites esenciales en forma de mezclas binarias. Se pudo inferir que el ácido láctico en mezcla con los tres aceites ejerció acción inhibitoria sobre el desarrollo de las tres cepas bacterianas. Se destacó la mezcla binaria de ácido láctico - orégano (0,02 % - 0,03%V/V), la cual resultó ser la más efectiva en comparación con las otras mezclas.

Se evaluó el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de romero a 0,12% V/V; orégano a 0,12%V/V, eugenol a 0,12%V/V, ácido láctico a 0,87% V/V, romero - orégano a 0,06%/0,06%V/V y láctico-orégano a 0,02%/0,03%V/V sobre el desarrollo de microorganismos aerobios mesófilos totales, coliformes, y psicrótrofos en muestras de carne almacenadas a 4°C durante 14 días. Las muestras con aceite de orégano (0,12% V/V) presentaron los menores recuentos finales de aerobios mesófilos, con valores de 10^3 UFC/g al tiempo final de la experiencia. A su vez, los recuentos de aerobios mesófilos hallados en las muestras con romero - orégano y láctico - orégano fueron de 10^7 UFC/g y 10^6 UFC/g respectivamente.

Los recuentos microbianos obtenidos luego de aplicar diferentes aceites esenciales así como ácido láctico, de forma individual y en mezclas, fueron modelados matemáticamente con la ecuación modificada de Gompertz con el fin de describir el desarrollo microbiano bajo los factores de temperatura de almacenamiento, tiempo y adición de sustancias antimicrobianas. Se estimaron los parámetros como el tiempo de latencia (LPD), velocidad específica de crecimiento (μ) y la máxima densidad poblacional (MPD).

Se evaluó la influencia de las sustancias en estudio en las características sensoriales y en la vida útil del músculo semitendinoso. En cuanto a los cambios de color (ΔE), las muestras control tuvieron valores de 26 unidades y las tratadas con aceites esenciales y mezclas binarias tuvieron un valor máximo de 12,66 unidades. El ensayo de análisis sensorial se realizó con la prueba de evaluación de aceptabilidad por atributos, para conocer la existencia o no de diferencias entre los diferentes tratamientos. También se determinaron los aspectos de aceptación de las muestras tratadas. Las muestras con mayores puntajes de aceptabilidad global (más de 6 en la escala hedónica) fueron las tratadas con ácido láctico (0,87% V/V) y la mezcla binaria de láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V).

Para la presente investigación, se definió la vida útil como el tiempo en que las muestras presentan una aceptabilidad sensorial de sabor y aceptabilidad global mayor a 6,40, recuentos microbianos menores a 10^7 UFC/g ($\text{Log UFC/g días}^{-1}$) y variaciones de color (ΔE) menor a 10. Considerando que el control presentó una vida útil de 3 días bajo refrigeración, los resultados indicaron que fue posible extender tres veces la vida útil de las carnes refrigeradas con la adición de ácido láctico (0,87%V/V) y con la mezcla láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V), en comparación con la muestra sin tratar.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Producción de carne en Argentina

La carne aporta nutrientes esenciales contenidos en proteínas, minerales, grasas, entre otros, y se cataloga como un alimento fundamental en la dieta, además es habitual consumirlo en los hogares de muchos países de Latinoamérica. En Argentina, adquiere especial relevancia considerando el valor de la producción nacional y los ingresos generados por las exportaciones (Herrera, 2005).

Con un total de 54 millones de animales al 31 de marzo de 2018, el stock ganadero bovino muestra una recomposición del 2,7% con respecto al 2017. Se destaca el aumento de la población bovina en Salta con 8,43%; Santiago del Estero, 4,58%; Córdoba, 4%, San Luis, 3,79%; y La Pampa con 3,76% y Buenos Aires, que tiene el 35% del rodeo del país, presenta una variación positiva del 3,44%. (FIFRA, 2018). La situación anterior resulta inesperada dado que se reportaron condiciones climáticas adversas como inundaciones primarias y luego sequías durante el 2017. En menos de dos años, la oferta nacional de carne vacuna se ha incrementado en 400 mil toneladas, consecuencia de que el stock de cabezas ha ido en aumento. Es así que en 2017 el aumento de las exportaciones se situó en 500000 toneladas representando el 18% de la demanda total, situándose Argentina en el sexto exportador de carne a nivel mundial (FIFRA, 2018). El consumo anual de carne vacuna promedio de la población Argentina es de 57,5 kg/habitante, siendo la carne que más se consume; en segundo lugar, se ubica la carne aviar (40 kg/habitante), en tercero la carne porcina (10 kg/habitante) y en cuarto, la carne ovina (2 kg/habitante) (Miazzo y Pisani 2015).

1.2 Características de la carne como materia prima

La carne constituye un alimento esencial en la nutrición humana. Se caracteriza por presentar valores de pH de 5,6 – 6,0 y una actividad acuosa superior a 0,98 (Campbell - Platt, 1995). En estas condiciones, se convierte en un medio de cultivo ideal para el crecimiento de microorganismos. De esta manera, el proceso de conservación de la carne, debe estar dirigido a mantener las condiciones ideales que impidan el desarrollo de microorganismos patógenos y retrasar el crecimiento de los alteradores.

La calidad de la carne, engloba numerosas características por las cuales el alimento una vez sometido a cocción resulta un producto con propiedades comestibles, aspecto atractivo y valor nutritivo adecuado para el consumo humano.

1.3 Características y composición de la carne bovina

De acuerdo con el Código Alimentario Argentino, la carne, se entiende como la parte comestible de los músculos de los bovinos, ovinos, porcinos y caprinos declarados aptos para la alimentación humana por la inspección veterinaria oficial antes y después de la faena. Comprende a todos los tejidos blandos que rodean al esqueleto, incluyendo su cobertura grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y todos aquellos tejidos no separados durante la operación de la faena (CAA, 2013).

Se caracteriza por presentar una composición química y valor nutricional específicos, que la hacen comestible y apta para el consumo humano. Sin embargo, estas características limitan su sensibilidad a la alteración producida por microorganismos, considerándose un vehículo importante para la difusión de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), siendo además susceptible a sufrir alteraciones de las características organolépticas relacionadas con la cadena de producción.

Químicamente, el músculo cárnico está compuesto por agua en un 64 a 82% siendo el componente mayoritario, proteínas 17 a 23%, lípidos 0,3 a 15%, cenizas 1 a 1,6%, hidratos de carbono menos de 1%. Es fuente de vitaminas del complejo B hidrosolubles, de minerales, mayoritariamente hierro y fósforo (Fennema, 2000). Las variaciones en su valor nutricional dependen de factores fisiológicos del animal y de la especie. Asimismo, cabe resaltar que los lípidos presentan un rango amplio y variable en el músculo, aumentando su alto valor nutritivo, otorgado también por su contenido proteico.

Con la muerte del animal, el músculo comienza a cambiar y trata de mantener su actividad metabólica. El músculo sigue consumiendo energía para mantener la integridad de las células, produciéndose el proceso de glucólisis anaerobia postmortem, el glucógeno se transforma en ácido láctico y dos moléculas de ATP; posteriormente, al hidrolizarse el ATP se origina un descenso del pH muscular, inhibiéndose progresivamente las enzimas, con lo cual la glucólisis llega a detenerse. El descenso del pH hace que las proteínas sean mucho más sensibles a la desnaturalización, disminuyendo su capacidad de retención de agua, lo

que provoca que las proteínas miofibrilares se aproximen a su punto isoeléctrico, determinando la exudación del músculo (Lawrie, 1977).

Algunas de las anomalías en el metabolismo post mortem son la posibilidad que se generen carnes PSE (Pálidas, Blandas y Exudativas) y DFD (Oscuras, Firmes y Secas). Las PSE aparecen en determinadas razas de cerdo, con propensión al estrés. Este tipo de carnes se caracterizan por una glicólisis postmortem muy rápida, debido a un tiempo de estrés muy corto antes del sacrificio, que causa pH bajo coincidiendo con la temperatura de la carne aún muy elevada (37 °C aproximadamente). En el músculo, se origina la precipitación de proteínas sarcoplasmáticas y aparece una menor capacidad de retención de agua debido a la desnaturalización de las proteínas miofibrilares (Sánchez y col., 2011).

Por otro lado, las carnes DFD se caracterizan porque el descenso de pH es poco marcado ya que las reservas de glucógeno del músculo se han agotado antes del sacrificio, produciéndose poco ácido láctico, dando como resultado un pH muscular final elevado (6,0) a las 24 horas después del sacrificio. De esta forma aparecen las carnes DFD, susceptibles a alteración microbiana (Fennema, 2000).

La glicólisis produce otros defectos que influyen en la calidad y propiedades de la carne, como es la tendencia a la oxidación de los pigmentos hasta la metamioglobina no deseable y la consiguiente oxidación de las grasas, produciendo un aumento de la concentración de precursores del sabor de la carne cocida (López y Casp, 2004).

1.4 Microbiología de la carne

El crecimiento microbiano en los productos cárnicos puede causar problemas, por lo tanto es fundamental conocer los microorganismos que alteran sus propiedades químicas y físicas, y que pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. Adicionalmente, es esencial saber cómo combatir a estos microorganismos indeseables.

La carne es uno de los alimentos más perecederos debido a sus características de composición, pH y actividad acuosa y constituye un medio muy favorable para la mayor parte de las contaminaciones microbianas. La profundidad del músculo de un animal recién sacrificado contiene una flora muy escasa, procedente en general del intestino y transportada al músculo por medio de la sangre. La superficie de la carne, en tanto, especialmente la canal, está mucho más contaminada por una flora diversa, que depende

fundamentalmente de las condiciones higiénicas de manipulación y del ambiente del matadero, incluyendo las superficies de tratamiento. En el frigorífico, por ejemplo, se puede contaminar al entrar en contacto con otras carnes; luego de largos periodos de almacenamiento en frío, puede proliferar una contaminación psicrófila que desarrolla a bajas temperaturas o también durante el transporte si las condiciones higiénicas no son las adecuadas, las canales pueden seguir contaminándose.

1.4.1 Flora bacteriana de la carne: Microorganismo alterantes

En la carne fresca se han encontrado distintos grupos de microorganismos, entre ellos bacterias Gram negativas de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae. En cuanto a las bacterias Gram positivas, se han reportado *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus* y bacterias lácticas del genero *Lactobacillus*. En cuanto a los grupos de hongos se han encontrado *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* y Levaduras (Lawrie, 1977; Davies y Board, 1998).

Las bacterias relacionadas con el deterioro de la carne descomponen proteínas y grasas, perjudican su composición produciendo malos olores, sabores y texturas. Las señales de deterioro más comunes son el olor anormal, en general debido a bacterias aerobias de la superficie de la carne y también a la aparición de mohos que producen manchas (Marianski y Marianski, 2010).

El deterioro profundo ocurre por la acción de microorganismos anaerobios facultativos; la decoloración está relacionada con alteraciones del pigmento muscular, que es descompuesto, debido al oxígeno del aire y a la presencia de compuestos flavínicos (Lawrie, 1977). Cabe señalar que el color depende de la concentración de mioglobina y del grado de oxidación, así como de la estructura de la carne (Ruíz de Huidobro y col., 2005). Bacterias tales como *Pseudomonas* spp. o *Brochotrix thermosphacta* causan decoloración y malos olores, pero no producen toxinas. Levaduras como *Trichosporum* y *Candida* y bacterias como *Pseudomonas* y *Achromobacter*, hidrolizan las grasas dando lugar a la formación de compuestos como ácido butírico causando lipólisis. Por otro lado, otras

bacterias intervienen en el agriado debido a la presencia de ácidos volátiles y no volátiles generados por la proteólisis microbiana (Pascual y Calderón, 1999).

Existen diferentes bacterias que causan putrefacción y se reproducen a temperaturas específicas. Algunas pueden crecer a bajas temperaturas en el refrigerador o congelador (Marianski y Marianski, 2010), produciendo cambios bioquímicos de los aminoácidos libres y nucleótidos que los microorganismos metabolizan produciendo ácido sulfhídrico, amoníaco, indol, cadaverina y otras sustancias de mal olor y consistencia viscosa (Lawrie, 1977).

La glucosa presente en la carne en concentraciones menores a 1%, puede ser útil para que se desarrollen los microorganismos de la superficie. Cuando hay un elevado número de carga microbiana (10^7 células/cm²) pueden atacar a los aminoácidos, causando un incremento en la concentración de amonio (Davies y Board, 1998).

1.4.2 Microorganismos patógenos

Además de los microorganismos propios que influyen en la alteración de la carne, se pueden encontrar gérmenes perjudiciales para la salud del hombre, procedentes de malas manipulaciones durante la preparación, o de animales enfermos (Pascual y Calderón, 1999). El incremento de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), causadas por microorganismos patógenos ha ido alertando progresivamente a las autoridades sobre la seguridad alimentaria. Este tipo de enfermedades se transmiten por los alimentos en general, y dependen del tipo de microorganismo que se haya desarrollado en el mismo.

La enfermedad alimentaria puede ser de dos tipos: intoxicación alimentaria, la cual se debe a la ingestión de una toxina formada por un microorganismo sobre el alimento antes de su consumo y la infección alimentaria, que se produce debido a la invasión, crecimiento y lesión del huésped, por parte de microorganismos patógenos en el alimento, que una vez en el individuo, pueden producir toxinas, lo que conlleva a una toxoinfección (Jay, 1994).

Los microorganismos patógenos tienen una amplia distribución en los animales, en el hombre y en el medio ambiente, por lo tanto es difícil esperar que se puedan eliminar por completo, de todos los estadios de la cadena alimentaria.

Existen factores de tipo extrínseco que influyen en la contaminación de alimentos por microorganismos patógenos, tales como períodos cortos de cocción, predisposición al consumo de alimentos crudos, malos hábitos en el momento de cocinar alimentos, etc., que pueden aumentar el riesgo de contagio.

Es fundamental conocer las características principales de estos microorganismos, sus factores de virulencia, principios de crecimiento, con el fin de generar propuestas tecnológicas para poder combatirlos.

1.4.2.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria esférica (coco), inmóvil, no esporulada, aerobia - anaerobia facultativa y Gram positiva. Se agrupa típicamente en racimos. Produce un amplio rango de factores de virulencia y patogenicidad: hialuronidasas, fosfatasas, coagulasas y hemolisinas. Son bacterias muy resistentes al calor, desecación y pueden crecer en medios con elevada salinidad (7,5% de NaCl). El crecimiento ocurre en un amplio rango de temperatura de 6,5 a 50 °C, siendo óptimo 30 – 40 °C, con valores de pH de 4 - 10 y actividad acuosa (aw) de 0,83 – 0,99 (Kaplan y Tenembaum, 1982).

La bacteria se encuentra generalmente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel o en la ropa, y de estos sitios *S. aureus* puede transmitirse a otras regiones del cuerpo o membranas mucosas. Es causante de infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario, nosocomiales. Produce lesiones superficiales de la piel y causa infecciones del sistema nervioso. Además provoca intoxicación alimentaria al liberar enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar super antígenos en el torrente sanguíneo (Velázquez, 2005; Bustos y col., 2006).

Uno de los principales factores para su identificación es la coagulasa; proteína asociada a la pared celular, que se puede encontrar ligada a la célula o de forma libre en el medio. La coagulasa se utiliza como marcador de la virulencia y permite diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas), asimismo, protege a la bacteria de la fagocitosis (Bustos y col., 2006).

S. aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen un grupo de enzimas y citotoxinas dentro de las cuales hay cuatro hemolisinas

(alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa. La función principal de estas proteínas se puede asociar con la destrucción de tejidos por medio de la capacidad que tiene el microorganismo de penetración e invasión tisular. Uno de los factores de virulencia más relevantes relacionado con toxoinfecciones alimentarias es la presencia de enterotoxinas (Velázquez, 2005; Pahissa, 2009).

Es un microorganismo de gran importancia clínica, en especial por las cepas meticilino resistentes (SAMR), siendo también considerado mundialmente uno de los agentes más importantes de enfermedades transmitidas por alimentos. El mayor interés de este microorganismo con respecto a la microbiología alimentaria, consiste en ser un agente etiológico de brotes de la intoxicación alimentaria denominada estafilocócica. Tiene la capacidad de elaborar enterotoxinas activas. Estas enterotoxinas son producidas por el 30 - 50% de las cepas de *S. aureus*. Se han descrito 8 serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A, B, C, D, E, G, H, I) siendo el serotipo A, el más común (Pascual, 2005; Pahissa, 2009). Los alimentos atribuidos a la intoxicación estafilocócica incluyen pollo, ovoproductos, ensaladas variadas integradas por huevos, atún, carne, productos cárnicos, así como productos de pastelería, sandwiches, leche y productos lácteos (ICMSF, 1986; Pascual, 2005).

La presencia de *S. aureus* en la carne se debe particularmente a cepas de origen animal y a cepas de origen humano, especialmente en el caso de carnes mal manipuladas en el sacrificio y en las canales, al no tener en consideración normas de higiene apropiadas para estos procesos. También la presencia de este microorganismo en los alimentos puede deberse a la contaminación directa por manipuladores colonizados. Si bien en la carne cruda, no presenta gran facilidad de desarrollo debido a la existencia abundante de flora competitiva, especialmente psicrótrofa y por el posterior almacenamiento en refrigeración, se puede suponer un riesgo de contaminación cruzada si hay contacto directo del producto crudo con un alimento cocido. Otros escenarios típicos que influyen en la intoxicación por *S. aureus* se deben a contaminación de alimentos tratados térmicamente y que fueron manipulados luego de su preparación y cocción (Sandel y Mckilli, 2004; Toldrá, 2009).

Si bien es considerado mundialmente uno de los agentes más importantes de ETA, no obstante, al tratarse de cuadros gastrointestinales leves, los brotes por este microorganismo, generalmente no se notifican (Ablonski y Borach, 1997). Con frecuencia, los casos de ETA

no son reconocidos o no son investigados. La Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (VETA) está integrada a los sistemas de vigilancia en salud pública en Argentina, y forma parte de los Programas de Control de la Inocuidad de los Alimentos Nacionales (CDC, 2011).

1.4.2.2 *Salmonella* spp.

Salmonella, es miembro de la familia Enterobacteriaceae. Es un bacilo Gram negativo, no esporulado, aerobio y anaerobio facultativo y crece a una temperatura óptima de 37 °C. Fermenta la glucosa, generalmente con producción de gas. Es capaz de multiplicarse a temperaturas que oscilan desde 6,7 a 45,6 °C, aunque crece óptimamente a 37 °C, también puede crecer bien a temperatura ambiente. El intervalo de pH se halla comprendido entre valores de 4,1 y 9,0. Su aw de crecimiento es variable y depende del alimento pero se encuentra aproximadamente entre 0,93 a 0,95 (Frazier y Westhoff, 1993).

Basándose en criterios fenotípicos, según el Comité Científico Veterinario de la Union Europea, el género *Salmonella* se divide en dos especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Los seres humanos son particularmente vulnerables a *S. typhi* y *S. paratyphi* A y B, debido a la capacidad de estas cepas para invadir y multiplicarse dentro de los tejidos del huésped (C.E, 2003).

Las Salmonellas que originan intoxicación alimentaria se clasifican en más de 2000 serotipos, capaces de invadir e infectar el organismo tanto del hombre como de los animales (Figuerola y Navarrete, 2002). *Salmonella* puede ser aislada del intestino del hombre y de los animales y de alimentos de origen animal. Generalmente se la asocia a problemas gastrointestinales, septicémicos y abortos gracias a su capacidad de invasión celular y supervivencia intrafagocítica (Frazier y Westhoff, 1993; Fura y col., 2007). De igual manera, las personas y los animales son directa o indirectamente la fuente de contaminación de los alimentos contaminados con *Salmonella*. Proviene principalmente de reservorios como aves de corral, ganado vacuno y porcino por lo tanto, son fuentes de infección importantes las carnes de estos animales y los huevos (Fura y col., 2007; CRESA, 2011).

La Salmonelosis es una zoonosis de distribución mundial, considerada una de las enfermedades de origen alimentario que se presenta con mayor frecuencia. Puede ser

consecuencia de la ingestión de gran número de células viables pertenecientes al género *Salmonella* (Frazier y Westhoff, 1993; Caffer y Terragno, 2008; Figueroa y Navarrete, 2002).

Los productos crudos son la fuente de la mayoría de los serotipos de Salmonellas que llegan a los alimentos cocinados. Tradicionalmente, los ovoproductos y los preparados a base de huevo o que contienen huevo crudo, como la mayonesa, cremas y otros alimentos como carnes poco cocinadas, de bovino y de cerdo especialmente, suelen estar vinculados a salmonelosis. Las aves y las carnes picadas pueden ser contaminadas con Salmonellas antes de que lleguen a la cocina y difundir la infección de los productos crudos a los cocinados mediante las manos, superficies y utensilios. Asimismo, los manipuladores son un punto de control importante, ya que se pueden convertir en fuente de infección directa. De igual forma, las deficiencias en procesos de producción, almacenamiento, distribución, consumo y la ausencia de un oportuno almacenamiento en refrigeración contribuyen al riesgo de infección por este importante microorganismo (Frazier y Westhoff, 1993; WHO, 1997; CDC, 2013).

En América Latina, las ETA representan alrededor del 70% de los casos de enfermedad diarreica aguda. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de acuerdo con datos reportados al SIRVETA (Sistema de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos) durante el período 1993 - 2002, se registraron 6332 brotes de ETA en 22 países de la región que afectaron a 230141 personas, de las cuales 317 murieron y un 18% fue producido por *Salmonella*. La baja frecuencia de notificación sobre estas enfermedades, hace que en América Latina no se tenga una idea clara sobre el impacto de *Salmonella* en la salud y en la contaminación de los alimentos (SIRVETA, 2000; INEI, 2005).

Estudios publicados en 2008 por el Laboratorio Central de Salud Pública y el Instituto Biológico Dr Tomas Perón, reportaron aislamientos de *Salmonella* spp. provenientes de muestras de carne fresca y lácteos recolectadas durante cinco años (Michelena, 2008).

Las Salmonellas alcanzan cifras importantes en los alimentos sin producir alteraciones detectables de su aspecto, olor e incluso sabor, por esto es indispensable aplicar tratamientos para destruirlas tales como calentamiento a 66 °C durante 12 minutos (Frazier y Westhoff, 1993).

De todas formas, la extrema variabilidad de distribución de esta bacteria en carnes, evita que se implementen de forma eficiente planes que aseguren un grado de confianza en la ausencia de *Salmonella*. De esta manera, sería necesario partir de un seguimiento regular en la planta, o en el campo para que el productor pueda eliminarlas en el animal vivo y controlar el problema en su origen (ICMSF, 1986).

1.4.2.3 *Escherichia coli*

La mayoría de las bacterias pertenecientes a la especie *Escherichia coli*, son huéspedes comunes de la microflora normal del intestino del hombre y de algunos animales de sangre caliente, por lo cual se encuentra habitualmente en sus heces.

E. coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos cortos, móviles, no esporulados, Gram negativos y anaerobios facultativos. Son fermentadores de lactosa y lo hacen con producción de ácido y gas. Algunas cepas de este género bacteriano son patógenas y pueden generar distintos cuadros clínicos graves en adultos y niños. Por su especificidad, *E. coli* se considera un buen indicador de contaminación fecal. Vive poco tiempo en el ambiente extra entérico, por lo que su presencia en los alimentos indica que la contaminación ha sido reciente. Asimismo, ha sido reconocido como un patógeno específico en enfermedades intestinales y extraintestinales. Se conocen varios tipos enterovirulentos de *E. coli* implicados en brotes de enfermedades de origen alimentario (Pascual, 2005).

Las cepas patógenas de *E. coli* asociadas a riesgos en salud pública que contaminan agua y alimentos, incluyen a las Enteropatógenas, Enterotoxigénicas, Enteroinvasivas y Enterohemorrágicas (Torres, 2010). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) es una de las principales cepas que contribuyen a enfermedades de transmisión alimentaria. Puede crecer en un rango de temperatura que oscila entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas EHEC pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una aw mínima de 0,95. Se destruye mediante la cocción de los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más. Produce toxinas conocidas como verotoxinas o toxinas Shiga (STEC). *E. coli* O:157H:7 es el serotipo más importante de EHEC debido al alto impacto en la salud pública (OMS, 2011). *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC),

produce factores de virulencia que desarrollan el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), el cual se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y constituye la causa más común de insuficiencia renal en los niños de corta edad. También puede causar enfermedad de gravedad variable, como diarrea acuosa, sanguinolenta y colitis hemorrágica. Los principales factores de virulencia incluyen adhesinas (como la intimina *eae*), otras toxinas y proteasas. Estos factores le permiten colonizar el intestino. Se cree que STEC no es invasiva y que la toxina puede ser absorbida desde el intestino y que allí puede comenzar a producir la enfermedad (Torres, 2010; OMS, 2011). La OMS considera el serotipo O:157H:7 como el más común y del cual se encuentra la mayor información disponible sobre *E. coli* enterohemorrágica. Dicho serotipo se puede distinguir de forma sencilla bioquímicamente de otras cepas de *E. coli*. Se puede transmitir al hombre por el consumo de alimentos contaminados, por contaminación fecal del agua y contaminación cruzada. Se considera como el principal reservorio el ganado, de esta manera la carne poco cocida o cruda se relaciona frecuentemente con este serotipo. La misma organización propone distintas alternativas preventivas para reducir la enfermedad; la aplicación de buenas prácticas de higiene antes, durante y después del sacrificio para reducir el número de agentes patógenos, son algunas opciones consideradas. Asimismo, para la eliminación de EHEC se ha considerado la aplicación de un tratamiento térmico y bactericida, sin embargo siempre existe riesgo de contaminación (OMS, 2011).

En Argentina, de acuerdo con el Ministerio de Salud de la Nación, se estima que el SUH es endémico y se producen entre 400 a 500 casos nuevos por año. Es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños y responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. El año 2008 presentó el número más alto de casos del período 2005-2013 (543), mientras que 2013 presentó el más bajo (319) (Antman y col., 2014). En la actualidad, es de vital importancia estudiar estrategias para evitar la proliferación de microorganismos patógenos como *E. coli*, es por ello por lo que algunos autores han realizado estudios con compuestos naturales para combatir este importante patógeno. Oussalah y col. (2007) evaluaron el efecto antimicrobiano contra *E. coli* O:157H:7 de veintiocho aceites esenciales para establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada uno. Se determinaron CMI menores a 0,5% V/V de aceites de los cuales se destacan orégano, eugenol, timol y carvacrol. A su vez han destacado que los aceites volátiles de

origen natural otorgan propiedades que otorgan sabor a las comidas sin afectar sus propiedades organolépticas.

1.5 El color superficial de la carne

El color de la carne fresca es una propiedad importante que influye en el mercado, se relaciona con el consumidor y con su decisión de compra. Datos sobre la estabilidad del color de la carne fresca dan una idea sobre las posibles preferencias que tienen los consumidores en la apariencia del producto. El aspecto de los productos cárnicos y la carne es un tema complejo que involucra la genética animal, las condiciones ante y post mortem, la química del músculo y muchos factores relacionados con el procesamiento de la carne, envasado, distribución, almacenamiento, exhibición y preparación final para el consumo (Mancini y Hunt, 2005; Goñi y col., 2007).

La carne fresca presenta en su interior el color rojo característico de la mioglobina, ésta se localiza en las fibras musculares rojas del corazón y los músculos esqueléticos. La función de la mioglobina es la de facilitar la difusión del oxígeno de los capilares existentes a las estructuras intracelulares, donde es utilizado en procesos de tipo oxidativos (Lanari, 1988). Si se realiza un corte y la carne entra en contacto con el oxígeno, adquiere un tono más brillante, característico de la oximioglobina. La estabilidad de ésta depende de las cantidades de oxígeno y de las sustancias reductoras presentes en los tejidos, ya que de existir la presencia de éstos, se inicia la formación de metamioglobina, que otorga a la carne un color pardo (Yúfera, 1970).

La mioglobina es una proteína compuesta de globina y un grupo prostético hemo que contiene hierro. La oxidación del hierro central dentro del grupo hemo es responsable de la decoloración, produciéndose metamioglobina. Cuando el grupo hemo del hierro ferroso se oxida a su forma férrica, el oxígeno se libera y es reemplazado por una molécula de agua (Faustman y col., 2010).

Es importante tener en cuenta nuevas tecnologías en la industria cárnica que no solo ayuden a extender su vida útil y minimizar el crecimiento de patógenos, sino que no afecten o mejoren la producción del color. En los últimos años, los antimicrobianos naturales, han sido estudiados para ser potencialmente reproducidos en la industria cárnica, debido a su relación con la seguridad alimentaria en comparación con preservantes sintéticos.

Productos como romero, timol y eugenol contienen compuestos fenólicos con conocidas propiedades antioxidantes y antimicrobianas, que a su vez pueden estar relacionadas con la conservación del color (Juhee y col., 2005).

1.6 Preservación de la carne

La diversa composición de nutrientes contenida en la carne, la convierte en un medio ideal para el crecimiento y propagación de microorganismos alterantes y patógenos. Es por esto que es indispensable buscar tecnologías eficientes de preservación para mantener la calidad y seguridad en su consumo. Algunos procesos utilizados en la preservación del alimento ayudan principalmente a inhibir el crecimiento microbiano y a minimizar cambios en su deterioro y su calidad sensorial (Aymerich y col., 2008).

1.6.1 Temperatura

La carne fresca, previa a su conservación en frío, puede contener microorganismos que crecen a temperaturas entre 15 °C y 35 °C (mesófilos); muchos de estos, son de origen animal o humano, incluyendo microorganismos patógenos que responsables del deterioro del tejido muscular. Asimismo, estos microorganismos prefieren temperaturas moderadas para crecer, siendo su tiempo de generación de aproximadamente 0,5 horas cuando se encuentran en la temperatura óptima. Igualmente, la carne también puede contener microorganismos que crezcan a temperaturas bajas (psicrótrofos) que son capaces de desarrollarse en las proximidades de 0 °C a 10 °C. Dentro de este grupo podemos encontrar a muchos de los microorganismos presentes en las carnes como flora habitual, tales como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* (ICMSF, 1983).

1.6.1.1 Refrigeración

La refrigeración es un punto muy importante en la higiene, seguridad, vida útil, apariencia y calidad de la carne. La temperatura óptima de refrigeración de la carne vacuna se localiza en un intervalo de 0 °C a 5 °C, intentándose que la temperatura inicial de las canales que se encuentran a 30 °C se reduzca a 5 °C o menos, lo más rápido posible.

Algunos de los factores que influyen en la vida útil de la carne en refrigeración son: la carga microbiana inicial, la presencia de tejidos protectores, la presencia de grasas insaturadas (las carnes son susceptibles a enranciarse), la temperatura y la humedad relativa en el almacenamiento (Lawrie, 1977).

A medida que la temperatura desciende por debajo de la óptima, el crecimiento microbiano se lentifica, aumentando también, notablemente la fase de latencia. No está totalmente aclarada la razón por la cual algunos microorganismos logran desarrollarse a bajas temperaturas y otros no; la disminución de la velocidad de crecimiento podría deberse a una desnaturalización reversible o irreversible de enzimas limitantes de la velocidad, o dichas temperaturas determinar la supresión de la síntesis enzimática.

Existen distintas formas de refrigeración para preservar la carne. En la refrigeración con flujo de aire frío, por ejemplo, la temperatura de la superficie de la canal disminuye y puede ayudar a que el músculo quede más seco, permitiendo inhibir el crecimiento microbiano. Cuando se incrementa la velocidad del aire y decrece la temperatura (controlando ambos parámetros) decrecerá el tiempo de refrigeración (Ockerman y Basu, 2004). Cuando se refrigera rápidamente el músculo, el rendimiento del proceso es mucho mayor debido a la baja evaporación en la superficie (Feldhusen y col., 1995).

1.6.2 Influencia del pH y del ácido láctico como preservador

La mayoría de las bacterias crecen mejor a un pH casi neutro, algunas se ven favorecidas por los medios ácidos y otras crecen bien en medios débilmente ácidos o alcalinos. Cada microorganismo tiene un pH de crecimiento óptimo, mínimo y máximo (Frazier, 1976).

El pH postmortem de la carne fresca es muy importante en lo referente al crecimiento de los microorganismos, ya que es un factor determinante en la vida útil del producto. El pH final depende de la cantidad de ácido láctico producido, es por esto que en animales sometidos a fatiga y ayuno antes del sacrificio, la cantidad de ácido láctico producido es poca, su pH será bajo, por lo que la carne será susceptible al ataque de microorganismos, disminuyendo así su vida útil (Frazier, 1976; Lawrie, 1977).

El pH de la carne de bovino varía entre 5,6 y 6,0. Los microorganismos que comúnmente alteran la carne, crecen mejor en condiciones de pH próximos a 7,0 o ligeramente alcalinos.

Cuando se alcanzan valores de pH ácidos, como por ejemplo 5,0, cualquier disminución en el pH aunque sea pequeña, determina una disminución de la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Lawrie, 1977). Es por esto que, varios microorganismos producen ácidos orgánicos y alcoholes por fermentación anaeróbica de los mismos sustratos del alimento y pueden inhibir a otros microorganismos presentes que pueden influir en el deterioro de la carne, así, estas bacterias pueden actuar como preservantes (Teotia, 1974).

Los ácidos orgánicos como el láctico se obtienen industrialmente por fermentación con *Lactobacillus* spp. en un medio de glucosa a partir del suero de la leche. Se utiliza como saborizante, regulador del pH en derivados cárnicos y puede ser usado como sinérgico de antioxidantes (Cubero y col., 2002). Posee actividad antimicrobiana que se debe a la reducción del pH, a la minimización de la disociación del ácido y la maximización de la toxicidad de esta molécula (Ingram y col., 1956), de igual manera, sus aniones son metabolizados en el interior de la célula microbiana, liberando protones H^+ que acidifican el interior de la célula e inhiben el transporte de nutrientes. Se produce así, un descenso del pH con lo que se inhibe el desarrollo de gérmenes causantes de alteración en la carne (Baird - Parker, 1985). El ácido láctico también ayuda a fijar el color y contribuye a reducir la capacidad de retención de agua de las proteínas, lo cual favorece el proceso de secado (Yúfera y Carrasco, 1977).

La forma no disociada del ácido láctico, penetra la membrana citoplasmática microbiana, así se reduce el pH intracelular y se produce una salida abrupta de protones. El ácido permeabiliza la membrana citoplasmática principalmente sobre las bacterias Gram negativas. Gana acceso al citoplasma celular microbiano a partir de prolinas proteicas de la membrana y produciendo cambios en su integridad, por lo que ésta perdería su capacidad de barrera (Eklund, 1983; Nikaido, 1996; Alakomi y col., 2000).

El ácido láctico se ha catalogado como un aditivo alimentario (artículo 1398 punto 18 del CAA), entendiéndose por tal a toda sustancia o mezcla de éstas que se agrega intencionalmente a los alimentos en cantidades ínfimas con el objeto de modificar sus características organolépticas, mejorar o facilitar su proceso de elaboración, conservación o su uso. Se debe tener en cuenta, que esta sustancia debe ser inocua para el organismo humano, sin que pueda presentar acción cancerígena, mutagénica, teratogénica, ni producir ningún tipo de toxicidad (Mohino, 1984).

La Unión Europea (UE) ha aprobado el uso del ácido láctico para reducir la posible contaminación microbiológica en la superficie de canales de bovinos, en medias canales o cuartos. El uso del ácido láctico con tal fin, debe realizarse aplicando buenas prácticas de higiene y los sistemas basados en los principios de APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control), pero en ningún caso debe considerarse como una sustitución de las prácticas higiénicas de sacrificio.

Su acción antimicrobiana preservadora ocurre en concentraciones cercanas a 0,5% y la FDA (U.S Food and Drug Administration) lo ha reconocido como un aditivo de alimentos tipo GRAS (Generally Recognized As Safe). Es importante tener en cuenta las dosis aceptadas de aditivos por la legislación de cada país, para su agregado; las cuales han sido realizadas en función de la no presencia de ningún riesgo de toxicidad (U.E, 2013).

Microorganismos como *Lactobacillus* spp. son resistentes a la acción del ácido láctico y pueden producir ácidos débiles lipofílicos en cantidades suficientes como para inhibir el desarrollo de algunas enterobacterias, principalmente del tipo de las patógenas como las *Salmonella* spp. En el caso de los microorganismos esporulados, éstos son altamente sensibles a la acción de pHs ácidos, utilizándose en algunos casos la acidificación en combinación con otros métodos de preservación para evitar el crecimiento de esporas germinadas. El uso de varios métodos de preservación en forma conjunta, es utilizado también, para la inhibición de la producción de toxina por parte del *Staphylococcus aureus* (ICMSF, 1983).

La acción antimicrobiana del ácido láctico agregado a las carnes, ha sido demostrada comprobándose que al adicionar este ácido hasta alcanzar una disminución del pH cárnico natural de 6,1 a 5,6, los parámetros cinéticos de la flora microbiana variaban significativamente, retardando el deterioro causado por el desarrollo bacteriano (Coll Cárdenas y col., 2008).

Existe una tendencia general a reducir el uso o disminuir los niveles de aditivos sintéticos añadidos a los alimentos, por lo tanto, ha aumentado el interés hacia los antimicrobianos naturales y a combinar estas sustancias con otros métodos de preservación con el fin de combatir la contaminación microbiana en la industria cárnica. De igual forma, el uso de antimicrobianos naturales, mejora el interés por el consumo “verde” y del cuidado del medio ambiente, generando interés científico sobre estas sustancias.

1.6.3 Aceites esenciales: Influencia como agentes antimicrobianos

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces). Pueden obtenerse a través de fermentación, extracción, destilación a vapor y por hidrodestilación asistida por calentamiento óhmico, siendo éste último uno de los métodos que presentan mayor rendimiento y conservación de la bioactividad de los aceites (Van de Braak y Leijten, 1999; Gavahian y col., 2017; Stratako y Koidis, 2016).

Las plantas producen una gran cantidad de compuestos secundarios como protección contra ataques microbianos e insectos. De hecho, muchos de éstos compuestos han sido usados en forma pura o extractos vegetales como alimento o aplicaciones médicas en humanos (Wallace, 2004).

Los aceites esenciales se concentran comúnmente en una región particular de las plantas y cuando esto ocurre en diferentes órganos en la misma planta, frecuentemente su composición es distinta (Oussalah y col., 2007).

Abarcan un amplio espectro de funciones tales como antiinflamatorias, antioxidantes, farmacológicas y anticancerígenas. Otros son biocidas contra bacterias, hongos, virus, protozoos, plantas e insectos. También se han utilizado para la elaboración de alimentos y bebidas, fragancias para perfumes y cosméticos. En los últimos años, se ha extendido la investigación para explorar y determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales (Conner, 1993; Kalemba y Kunicke, 2003).

Debido a las distintas propiedades que tienen los aceites esenciales, se han evaluado las diversas funciones que pueden ejercer estos compuestos contra microorganismo patógenos, por lo tanto, la posibilidad de ser utilizados como un método de eliminación en la industria alimentaria, ha ido incrementándose.

Las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales y sus componentes son explorados e investigados en productos como selladores dentales y antisépticos. En la industria alimentaria, un conservante (DMC Base Natural) producido en España que contiene 50% de aceites esenciales de romero, sábila y cítricos ya está disponible de forma comercial. Aunque el contenido exacto de estos productos no se conoce, estos probablemente pueden contener uno o más aceites esenciales dispersos en soluciones como citrato de sodio (Cutter, 2000).

1.6.3.1 Estructura Aceites esenciales

Están constituidos por mezclas de compuestos volátiles de bajo peso molecular, biosintetizados en diversos órganos de los vegetales. Los componentes de los aceites esenciales se dividen en: (i) compuestos de origen de los terpenos y (ii) compuestos aromáticos.

Los compuestos terpénicos se presentan naturalmente en las plantas y se encuentran como componentes principales de la mayoría de los aceites esenciales. Con base en sus propiedades estructurales y funcionales, los compuestos terpénicos se han clasificado de acuerdo a su unidad básica estructural isopreno que contiene cinco carbonos. Los compuestos de terpeno existen en las formas mono, sesqui, hemi, di, tri y tetraterpenos. Los monoterpenos contienen dos unidades de isoprenos que son responsables de construir la mayor parte de todos los aceites esenciales (Bakkali y col., 2008).

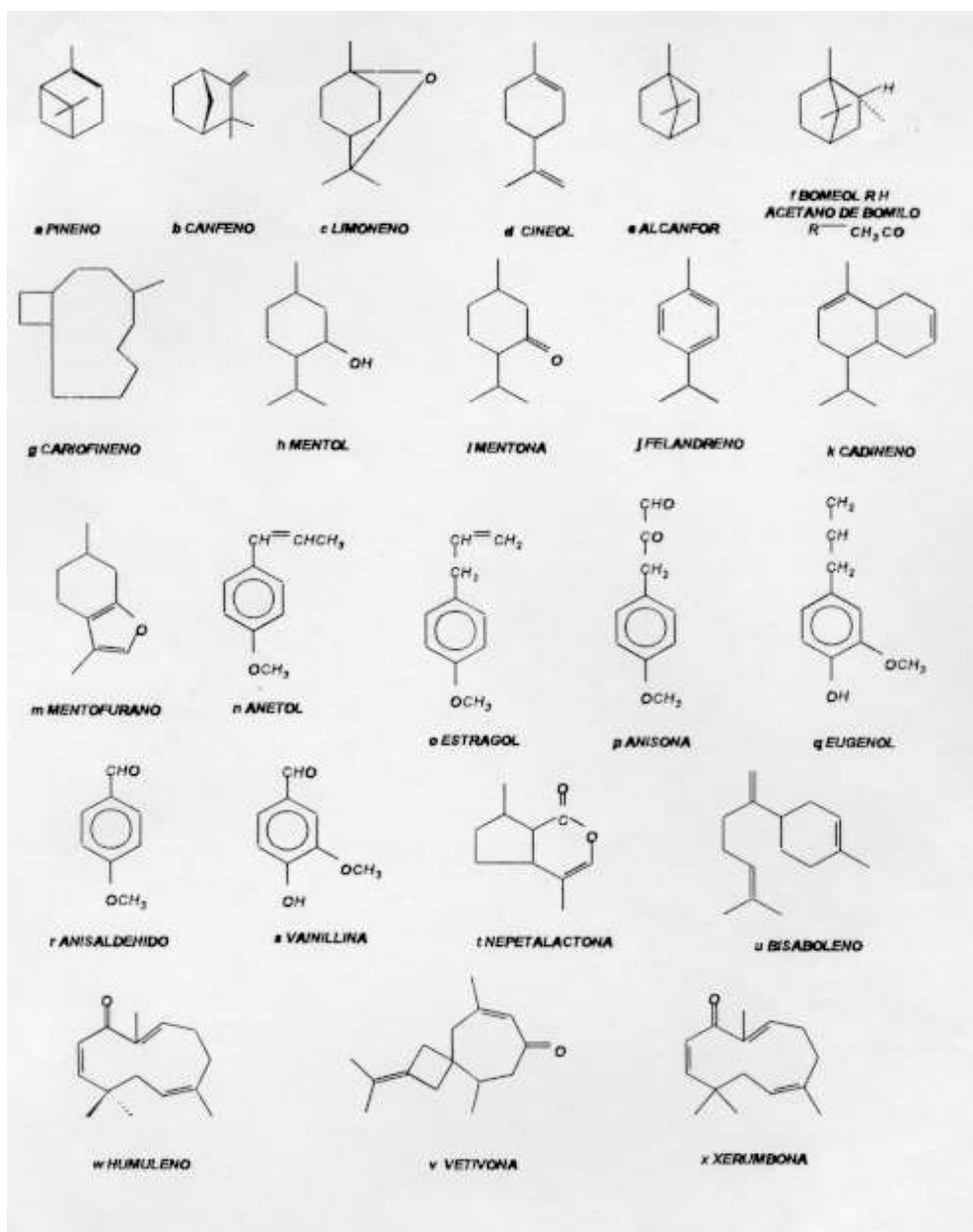


Figura 1. Diferentes tipos de estructuras en los Aceites Esenciales.

El sesquiterpeno contiene tres unidades de isopreno, y sus propiedades funcionales son similares a los compuestos de monoterpeno.

Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano, como aldehídos, alcoholes, fenoles, metoxi y dioxi metileno en forma natural.

Pocos compuestos sulfúricos y nitrogenados presentes en aceites esenciales también están caracterizados como constituyentes esenciales de las plantas (Wendakoon y Sakaguchi, 1995; Bakkali y col., 2008; Tavakolpour y col., 2017).

Los distintos tipos de estructuras más comunes de los aceites esenciales se detallan en la Figura 1 (Bakkali y col., 2008).

1.6.3.2 Mecanismos de acción antimicrobiana

Se han realizado numerosos estudios en aceites esenciales para confirmar la eficacia biológica sobre bacterias y hongos. Sin embargo, varios autores e investigaciones realizadas han sugerido varios mecanismos de acción, pero es difícil predecir exactamente su mecanismo ya que los aceites esenciales contienen distintos componentes y su acción antimicrobiana no puede ser confirmada por la acción de un único compuesto. Además, diferentes aceites o sus diferentes componentes presentan un modo de acción antimicrobiano no solo en un lugar de la célula sino en distintos (Carson y col., 2002). En la Tabla 1 se detallan algunos componentes de los aceites esenciales con acción antimicrobiana (Bauer y col., 2001).

Su naturaleza hidrofóbica, les permite interactuar con la membrana lipídica de bacterias patógenas y sus compuestos fenólicos alteran la membrana celular. Sus compuestos volátiles se unen a proteínas de la membrana celular, estas proteínas son enzimas que mantienen las propiedades funcionales de almacenamiento de hidratos de carbono en la membrana lipídica, así podrían ser responsables de la inhibición en sus funciones sobre las células (Wendakoon y Sakaguchi, 1995). También traspasan la membrana citoplasmática, desorganizan la membrana en las distintas capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos (Knobloch y col., 1989; Li y col., 2014; Stratako y Koidis, 2016).

Los aceites esenciales han presentado diversos efectos biológicos tales como citotóxicos, fototóxicos y mutagenicos. La citotoxicidad incluye daños sobre la membrana en la bacteria. La permeabilización de las membranas se asocia con la pérdida de iones y reducción en el potencial de membrana y colapso en la bomba de protones (Knobloch y col., 1989; Sikkema y col., 1995; Helander y col., 1998; Ultee y col., 2000; Di Pasqua y col., 2007).

Tabla 1. Componentes de aceites esenciales que presentan efecto antimicrobiano (Bauer y col., 2001).

Nombre común de la planta	Nombre científico de la planta	Componente	Concentración máxima del componente en el aceite esencial (%)
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i>	Linalool	26
		E-2-decanal	20
Canela	<i>Cinnamomum zaylandicum</i>	Trans-cinnamaldehído	65
			80
		Carvacrol	64
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Timol Terpineno	2-52
		Cymeno	52
		Pineno	2-25
		Acetato de bornil	0-17
		Canfor	2-14
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,8 Cineolo	3-89
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75-85
		Acetato de eugenil	8-15
		Timol	10-64
		Carvacrol	2-11
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Terpineno	2-31
		Cimeno	10-56

Algunos estudios realizados por Bakkali y col., (2008) han demostrado que diversos aceites esenciales presentan actividad mutagénica sobre el material de algunas bacterias y levaduras. La exposición a aceites esenciales podría inducir daño mitocondrial que involucra a la membrana y al ADN, dando lugar a deficiencias en la respiración celular y a pequeños cambios mutagenicos en el citoplasma. Todo ello depende de la composición del aceite esencial, la velocidad de penetración en el citoplasma y de su toxicidad.

Ultee y col. (2000) realizaron estudios en relación a la actividad antimicrobiana de carvacrol (presente en aceites de orégano y tomillo) sobre *B. cereus*, un esporoformador patógeno en alimentos. Expusieron células vegetativas de este microorganismo a concentraciones de carvacrol mayores a 1mM, que permitieron la extensión de la fase de latencia, una disminución de la tasa de crecimiento microbiano y en la densidad poblacional. Demostraron también que el compuesto produjo un incremento en la salida de

protones, disminución en el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática e inhibición en la síntesis de ATP. Finalmente el evento siguiente fue la muerte celular.

Otros estudios realizados por Delgado y col. (2003) demostraron que el timol al ser un isómero del carvacrol puede desintegrar la membrana externa e incrementar la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP en células de *E coli* y *Salmonella typhimurium*.

1.6.3.3 Aceites esenciales en productos cárnicos y en distintos alimentos

Existe un interés creciente en el uso de los aceites esenciales en la industria alimentaria como conservantes naturales, para evitar el deterioro de alimentos por parte de microorganismos y disminuir la transmisión de enfermedades alimentarias, con el fin además, de satisfacer las demandas de los consumidores al reducir el uso de componentes sintéticos.

Gracias a los estudios realizados por Board y Gould (1991), muchas investigaciones fueron llevadas a cabo para confirmar la eficacia de los aceites esenciales como preservantes naturales en alimentos. Por ejemplo, en un estudio realizado por Koutsoumanis y col. (1999) se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite de orégano sobre *Salmonella* spp en una ensalada, evidenciándose la reducción de la población bacteriana en poco tiempo.

Existen algunos factores que pueden influir en la eficacia de los aceites esenciales en alimentos, tales como algunas condiciones intrínsecas y extrínsecas propias de los distintos patógenos, dependiendo de la matriz alimentaria en la que se encuentren; los contenidos grasos de los alimentos y el número de microorganismos presentes en la matriz (Smith - Palmer y col., 2001; Gill y col., 2002; Mejlholm y Dalgaard, 2002); también algunos ingredientes como proteínas (Shelef, 1983); adicionalmente, alimentos con aditamento de sales pueden influir en la eficacia de aceites esenciales en modelos alimentarios (Shelef y col., 1984) y distintas propiedades de los alimentos como la miscibilidad del aceite en fase líquida o sólida también pueden limitar el potencial antimicrobiano (Hammer y col., 1999; Skandamis y Nychas, 2000).

Solomakos y col. (2008) probaron mezclas de aceite esencial de timol a distintas concentraciones con nisina sobre carne de res picada inoculada con *L. monocytogenes*. La combinación de timol a 0,6% y nisina a 1000 UI/g mostró una actividad sinérgica contra el

patógeno. El efecto de esta combinación produjo un efecto inhibitorio de 2 log UFC/g luego de un almacenamiento a 4 °C, durante una semana.

La mayoría de los estudios que buscan determinar actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en matrices de alimentos constan de ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). En ellos se impide el crecimiento de la bacteria enfrentando un número concreto de unidades formadoras de colonia (UFC) de la bacteria en cuestión con el agente antimicrobiano. Al ser aceites esenciales liposolubles, se realizan diluciones dobles o seriadas de los aceites en caldos con emulsionante. A la hora de determinar la CMI, hay que tener presente la volatilidad de los compuestos y el grado de difusión en el medio (Zaika, 1998).

La UE está constantemente generando recomendaciones y leyes para el uso de compuestos volátiles de plantas y aceites esenciales en alimentos. La FDA considera a los aceites esenciales como compuestos seguros para la salud de los consumidores, entre los que incluyen al aceite de pimienta blanca, de anís, pimienta negra, de alcaravea, de laurel dulce, timol, entre otros.

Los aceites esenciales pueden ser considerados como nuevos aditivos alimentarios, si se agregan a alimentos o productos alimenticios con el fin de servir como aromatizantes. Sin embargo, es necesario realizar estudios de toxicidad y de seguridad, así como lo solicita la FDA (Burt, 2004).

Existe una falta de conocimiento sobre la eficiencia de las combinaciones de los aceites esenciales con otros obstáculos (Paster y col., 1990, Paster y col., 1995; Skandamis y Nychas, 2000; Tassou y col., 2000). Así, por ejemplo, para superar la tolerancia a las bajas temperaturas de los aceites esenciales, se considera que el uso de estos fitoquímicos naturales en combinación con ácido láctico o lactato, ácido cítrico o nisina podría ser prometedor (McCue y col., 2005; Shetty y Lin, 2005; Solomakos y col., 2008). Naveena y col., (2006) utilizaron la combinación de 2% V/V de ácido láctico, 0,1% de clavo de olor y 0,5% P/V de vitamina C en carne de buey, observando una reducción significativa de los recuentos de microorganismos heterótrofos totales, coliformes y psicrótrofos, con respecto al control.

Recientemente algunos investigadores demostraron efectos antimicrobianos del aceite de tomillo sobre *B. subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *S. aureus* atribuido

principalmente a su componente principal, el timol. Este compuesto causa la perturbación de lípidos en la membrana microbiana del plasma y penetra en la célula ejerciendo efectos antimicrobianos (Kumar - Trivedi y col., 2015; Lee y col., 2018).

En este sentido, una estrategia prometedora para mejorar o ampliar la actividad antimicrobiana de estos compuestos parece ser la combinación de dos o más compuestos, sin embargo esto ha sido escasamente explorado (Alzamora y col., 1998).

1.6.3.4 Eugenol

Eugenol (4 - alil - 2 - metoxyfenol) es un compuesto fenólico extraído como aceite esencial del clavo de olor (*Eugenia aromatica*), y ha sido conocido por su efecto analgésico, anestésico y antiinflamatorio. Se usa en la forma de mezclas para cemento dental y como material de restauración en la industria dental. Pertenece a la clase de aceites esenciales GRAS por la FDA (Blaskyk y Holley, 1998). También ha sido reconocido como antioxidante (Jirovetz y col., 2006) y probado como agente antibacteriano sobre microorganismos como *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes* (Filgueiras y Vanetti, 2006). El eugenol se conoce por su efecto antibacteriano conocido como bactericida de amplio espectro, biodegradable, seguro y no tóxico (Cui y col., 2018).

Varios estudios han sugerido que la acción antimicrobiana del eugenol, se desarrolla a través de daños sobre la membrana plasmática, la cual incrementa la permeabilidad no específica de la misma (Gill y Holly, 2006). Su naturaleza hidrofóbica permite que ingrese a la membrana celular de las bacterias Gram negativas que contiene lipopolisacáridos y alterar su estructura. Evidencias revelan que el grupo hidroxilo del eugenol se une a proteínas, afectando la acción enzimática en microorganismos como *Enterobacter aerogenes* (Burt, 2004).

Se han realizado distintos estudios que resaltan la gran importancia de este aceite esencial en el control de bacterias patógenas en diversas matrices alimentarias. Autores como Shah y col. (2013), evaluaron el eugenol encapsulado con conjugados de aislado proteico en leche bovina probada sobre *E. coli* O:157:H7 y *Listeria monocytogenes*. Se determinaron

valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 0,25 g/L del aceite para ambos microorganismos.

Otros investigadores (Blaskyk y Holley, 1998) probaron mezclas de eugenol, glicerol de monolaurato y citrato de sodio sobre microorganismos alterantes y patógenos en carnes (bacterias lácticas, *E. coli* O:157H:7 y *L. monocytogenes*). La mezcla más eficiente con efecto antimicrobiano fue de 250 ppm de glicerol de monolaurato, 1000 ppm de eugenol y 0,4% de citrato de sodio. Las bacterias lácticas y *E. coli* O:157H:7 fueron resistentes a los tratamientos, sin embargo *L. monocytogenes* fue mucho más sensible.

1.6.3.5 Aceite esencial de romero

El aceite esencial de romero proviene de la especie vegetal *Rosmarinus officinalis* L. perteneciente a la familia *Lamiaceae*. Es una especie originaria de la región mediterránea, rica fuente de metabolitos activos. Es frecuentemente utilizada en la medicina tradicional por sus efectos digestivos, antiespasmódicos y carminativos (Abutbul y col., 2004). Históricamente, el romero ha sido utilizado como agente medicinal para tratar cólico renal, y para aliviar los síntomas causados por trastornos respiratorios. Se utilizan extractos de romero en aromaterapia para tratar enfermedades relacionadas con la ansiedad (Oluwatuyi y col., 2004).

El aceite esencial de romero es considerado como un antimicrobiano natural que puede ser utilizado en la producción de nuevos agentes con actividad antimicrobiana para la industria farmacéutica y alimentaria (Tantaoui – Elaraki, 2005). También ha sido reconocido como antioxidante y es utilizado como saborizante en alimentos y bebidas (Shylaja y Peter, 2004).

La composición del aceite de romero incluye compuestos como rosmanol, rosmariquinona, rosmaridifenol y carnosol. Los compuestos principales responsables de la actividad antimicrobiana son fracciones no volátiles como el carnosol, ácido romérico, y compuestos fenólicos di - terpenoides, los cuales son el componente principal de la fracción apolar de los extractos de romero. El carnosol está en concentraciones que oscilan entre 3 - 89% (Cuvelier y col., 1999). Adicionalmente Kumar Sahoo y col., (2011) demostraron que uno de los componentes principales del romero, es el 1,8 - cineol (o eucaliptol), el cual ha

confirmado un efecto antimicrobiano contra *M. luteus*, *S. epidermis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Su efecto se atribuye a su naturaleza lipofílica la cual le permite entrar en las estructuras de la membrana, y expandirse, dificultando los procesos de transporte de hierro y respiración celular (Zengin y Baysal, 2014).

Se han realizado estudios *in vitro* con extractos de *R. officinalis* en los que se ha evaluado su actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Rota y col. (2004) evaluaron la actividad de *R. officinalis* contra microorganismos de interés alimentario como *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli* O:157 H:7, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. En estudios realizados por Moreira y col. (2005) se identificó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero contra varias cepas de *E. coli*.

Smeti y col. (2013) utilizaron el aceite esencial de romero para incrementar la vida útil de carne de cordero, determinando que al usar bajas dosis de este aceite no hubo pérdida de color, ni oxidación lipídica en el músculo.

Un reciente estudio realizado por Lorenzo-Leal y col. (2019) demostró un efecto antimicrobiano eficaz producido por aceites esenciales de pimienta, tomillo y romero sobre *S. typhimurium* y *L. monocytogenes*. Es posible que los componentes principales de la pimienta y el tomillo pueden relacionarse con el efecto antibacteriano observado. Se identificó como componente principal del aceite esencial de pimienta, el eugenol (89,55%), utilizado para proteger alimentos de diferentes microorganismos durante el almacenamiento, y ha sido reportado como un antibacteriano efectivo contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella typhi* a través de la inhibición de la descarboxilasa, amilasa, proteasa y por el deterioro de la pared celular (Lee y col, 2018).

1.6.3.6 Aceite esencial de Orégano

El aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*), proviene de una hierba de la Familia *Labiatae* y ha sido utilizado desde hace larga data como agente saborizante en carnes.

Un análisis químico del aceite esencial de orégano reveló la presencia de varios compuestos, la mayoría de los cuales poseen importante actividad antioxidante y

propiedades antimicrobianas (Exarchou y col., 2002). Carvacrol y timol son dos compuestos fenólicos primordiales que constituyen alrededor del 78 - 85% del aceite de orégano y son los principales ingredientes responsables de la actividad antimicrobiana (Kokkini y col., 1997). Igualmente, compuestos como el monoterpeno, γ - terpineno y p - cimeno también influyen como antimicrobianos (Burt, 2004). En la Figura 2 se detalla la composición química del aceite de orégano (Gutiérrez y col., 2009). Adicionalmente se ha demostrado que los componentes del aceite esencial del orégano tienen una actividad antimicrobiana importante sobre algunos microorganismos tales como *S. lutea*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis* y *B. cereus* (Sarikurkcu y col., 2015).

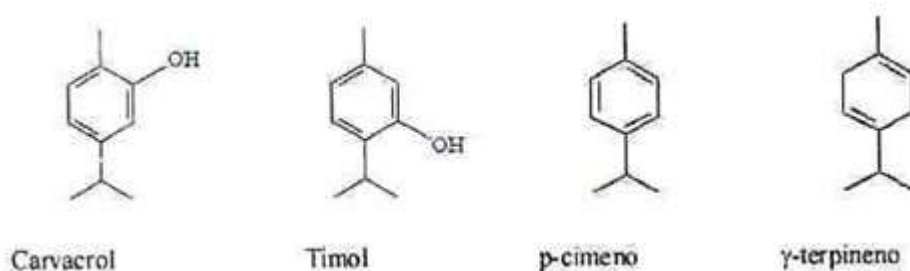


Figura 2. Estructuras químicas de los componentes principales del aceite esencial de Orégano

Diversas investigaciones han demostrado influencia del aceite esencial de orégano en carnes, resaltando eficazmente la inhibición en microorganismos alterantes (Tsigarida y col., 2000). Soultos y col. (2009) publicaron un estudio donde se ensayó aceite de orégano en carne de conejo refrigerada, inoculada con *Pseudomonas* spp, *Brochothrix thermosphacta* y Enterobacteriaceae. Los resultados mostraron una considerable reducción de estos microorganismos en comparación con el control.

La evaluación de agentes antimicrobianos en combinación es necesaria debido a que un microorganismo puede ser resistente a la inhibición de un solo compuesto antimicrobiano, sin embargo, al ser expuesto a una combinación de estos agentes, se puede aumentar la actividad antimicrobiana (Eliopoulos y Moellering, 1991). También, el desarrollo microbiano y su interacción con los compuestos antimicrobianos pueden estudiarse mediante la aplicación de modelos matemáticos, los cuales, permiten predecir el comportamiento de los microorganismos sometidos bajo un conjunto de determinadas condiciones ambientales.

1.7 Microbiología predictiva: Modelos matemáticos

Cada uno de los factores intrínsecos de un alimento influye sobre el crecimiento microbiano, favoreciendo así el desarrollo de unos microorganismos, en lugar de otros (Buchanan y Bagi, 1994). En los alimentos existe un amplio rango de nutrientes disponible para el crecimiento microbiano, sin embargo el pH, el a_w , la temperatura de almacenamiento en combinación con aditivos y conservantes pueden llegar a controlarlo. Teniendo en cuenta que muchos de estos factores funcionan de manera combinada, es ideal predecir la respuesta de los microorganismos a estas variables, pudiéndose estimar su desarrollo en los alimentos. De esta manera, se puede utilizar la microbiología predictiva, relacionando cada factor que determina el crecimiento microbiano con la supervivencia de los microorganismos (García - Gimeno y Cosano, 1994).

La microbiología predictiva se encarga de asociar las respuestas microbianas a condiciones ambientales y permite una evaluación objetiva de los procesos y del almacenamiento, en la seguridad alimentaria y en la calidad de los alimentos. Esto incluye conocimientos sobre el comportamiento microbiano en los alimentos y la derivación de los modelos matemáticos (McMeekin y Ross, 2002).

El desarrollo de modelos matemáticos ha permitido predecir la velocidad de crecimiento de los microorganismos (Chang, 1998). De esta manera y con el uso de esta herramienta, cuestiones sobre el deterioro microbiano de los alimentos, seguridad alimentaria y nuevas tecnologías de conservación de alimentos, pueden responderse mediante la combinación de resultados modelados bajo estas técnicas y un análisis objetivo basado en el conocimiento científico (Presser y col., 1997).

Los modelos predictivos microbiológicos pueden dividirse en modelos cinéticos y de probabilidad. Ambos se relacionan, ya que la probabilidad de detección de crecimiento durante un período de tiempo específico depende de la multiplicación del microorganismo, así como de la fase de latencia y del tiempo de generación, es decir, depende de los parámetros cinéticos (Tienungoon y col., 2000).

La aplicación de modelos matemáticos se realiza en dos etapas principales: modelado de la curva de crecimiento del microorganismo y descripción de la variación de los distintos parámetros que afectan a dicha curva. Estas curvas se ajustan y sus parámetros se derivan usando programas computacionales (Buchanan, 1991).

La elaboración de un modelo matemático implica la validación del mismo, lo cual comprende una primera etapa en la cual se cultivan los microorganismos en medios sintéticos, que se preparan a base de ingredientes de composición química conocida, cuya complejidad está determinada por la capacidad biosintética del microorganismo en cuestión (Rodríguez, 2003). Estos ensayos se realizan bajo combinaciones de los factores limitantes, diferentes a las que se emplean en la construcción del modelo, de esta manera se podrían comparar los resultados experimentales con los predichos. Luego de culminarse esta etapa, se realizan ensayos de validación con un alimento elegido, bajo condiciones de interés, así se comparan los resultados con los predichos. Esta metodología es fundamental para predecir el comportamiento microbiano en la matriz alimenticia seleccionada (Whiting y Masana, 1994).

Los modelos se pueden clasificar en tres niveles:

1) Modelos de nivel primario: En estos se describen cambios en el número de microorganismos en función del tiempo bajo ciertas condiciones ambientales. Consideran el parámetro de crecimiento tardío, la tasa de crecimiento promedio y la concentración inicial de células. Los modelos se pueden cuantificar por ejemplo en UFC/mL, formación de toxinas, productos metabólicos, absorbancia o impedancia. Ejemplos de estos modelos son la ecuación de Gompertz, la ecuación exponencial y el modelo logístico. El de Gompertz es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano (Gibson y Roberts, 1989; Zwietering y col., 1990).

2) Modelos de nivel secundario: Describen la tasa de crecimiento como una función de condiciones determinadas de temperatura, pH, nivel de la sal, entre otras. De esta manera, se describen las respuestas de los parámetros del modelo primario al cambiar determinadas condiciones de desarrollo. Ejemplo: ecuación de Arrhenius, modelo de la raíz cuadrada.

3) Modelos de nivel terciario: Generan aplicaciones de software fáciles de usar que pueden ser sistemáticamente utilizados. Estos softwares transforman a los modelos de nivel primario y secundario en programas más confiables. Permiten calcular la respuesta de los microorganismos en las distintas condiciones, comparar los efectos de dichas condiciones o contrastar el comportamiento de varios microorganismos.

Estos modelos pueden ser caracterizados como puramente descriptivos o probabilísticos (empíricos) o basarse en criterios microbiológicos (cinéticos). En los primeros se

determinan si para un determinado microorganismo, las condiciones del medio son óptimas para su desarrollo o presenta bajas o nulas probabilidades de sobrevivir. Permiten predecir la probabilidad de que los microorganismos crezcan dentro de un periodo dado. No indican la velocidad a la que se producen.

Por el contrario, los segundos determinan la curva de desarrollo de los microorganismos presentes en los productos alimenticios, por ejemplo el periodo durante el cual el número de microorganismos en el alimento es mínimo y su valor específico, hasta que dicho número aumenta siguiendo la curva de crecimiento normal. Consideran la velocidad de respuesta (crecimiento o muerte) como tiempo de demora y la máxima densidad poblacional o la inactivación o modelos de supervivencia.

Los modelos cinéticos y los probabilísticos pueden ser relacionados, ya que la probabilidad de detectar el desarrollo de un microorganismo durante un determinado periodo de tiempo depende de la multiplicación, de la fase logarítmica y del tiempo de generación microbiana, o sea de parámetros cinéticos (Tienungoon y col., 2000).

De igual manera, ayuda a determinar la estabilidad microbiana en productos nuevos durante el diseño experimental, identificar y establecer puntos críticos de control, predicción de crecimiento y número de microorganismos. Los modelos podrían ayudar a reducir la necesidad de exámenes microbiológicos, permitiendo así un considerable beneficio económico y las desventajas que podrían presentarse serían que las predicciones no fueran del todo precisas indicando solamente una tendencia (Chang, 1998; Coll Cárdenas, 2005).

1.7.1. El modelo matemático de Gompertz

La ecuación de Gompertz es una función de doble exponencial basada en parámetros que describen una curva sigmoideal asimétrica. Es uno de los modelos más utilizados para describir el desarrollo microbiano determinando la respuesta de los microorganismos bajo diversas combinaciones de factores. Permite estimar parámetros tales como tiempo de latencia (LPD), velocidad específica de crecimiento (μ) y la máxima densidad poblacional (MPD) de los microorganismos en condiciones específicas (Gibson y col., 1988; Zwietering y col., 1990).

Algunos estudios han utilizado esta ecuación para modelar el crecimiento microbiano de especies en particular sobre matrices alimentarias específicas. Signorini (2008), modeló el

crecimiento microbiano de *E coli* O:157H:7 en carne vacuna, basado en revisiones científicas previas donde se exponían de manera completa modelos predictivos de crecimiento del patógeno en carne en función de la temperatura (5 °C a 34 °C) y pH (5,6 – 6,5). Utilizó el modelo de Gompertz, en el cual algunos parámetros (máxima densidad y duración en la fase de latencia) ayudaron a determinar el alcance de la fase de latencia por parte del patógeno, evitando obtener valores extremadamente elevados, mostrándose así el efecto de los tratamientos evaluados.

Otros estudios desarrollados en carne han utilizado este modelo matemático para determinar el comportamiento microbiano de distintos microorganismos sometidos a diferentes tratamientos dentro de este sistema alimentario. Coll Cárdenas y col. (2008) evaluaron los efectos de temperatura de almacenamiento, permeabilidad de la película de empaque (EVA SARAN EVA) y el pH natural de la carne sobre diferentes especies bacterianas aisladas del músculo. Lograron predecir la duración de la fase de latencia de las Enterobacterias estudiadas, además estimaron los recuentos finales al término del periodo de almacenamiento. Así, confirmaron la importancia de estos dos parámetros como agentes reductores del desarrollo de estas Enterobacterias. De esta manera, los resultados obtenidos modelados con la ecuación de Gompertz, permitieron predecir el comportamiento de crecimiento y desarrollo generado por los microorganismos aislados.

Un trabajo realizado por Álvarez y col. (2016) demostró que el uso combinado de ácido láctico, orégano y luz UV en carne refrigerada es eficaz para producir una reducción de los recuentos de aerobios mesófilos, *Pseudomonas* sp y enterobacterias. El uso del modelo de Gompertz y de regresión lineal fueron usados para cuantificar el crecimiento microbiano en todas las condiciones estudiadas.

Considerando que la carne es un alimento de amplio consumo a nivel mundial se requiere nuevas tecnologías para controlar cambios sensoriales que alteran su estabilidad y la diseminación de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos. El empleo de aceites esenciales, temperaturas de refrigeración, ácido láctico podrían extender la vida útil de carnes obteniendo un producto de calidad higiénica sanitaria adecuada con buenos atributos de color y sabor.

2. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Objetivos:

2.1.1 Objetivo general

Evaluar la aplicación de tres aceites esenciales como antimicrobianos naturales, tales como romero, orégano y eugenol conjuntamente con ácido láctico y su aplicación en carnes bovinas refrigeradas.

2.1.2 Objetivos específicos

- i) Determinar la CMI de preservadores naturales (aceite de romero, eugenol, orégano y ácido láctico) y mezclas de los mismos sobre microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli*, *Salmonella sp* y *Staphylococcus aureus*.
- ii) Estudiar la aplicación de los antimicrobianos estudiados en el punto i) en muestras de carne durante su almacenamiento a 4 °C, sobre el desarrollo de microorganismos alteradores comúnmente encontrados en carnes bovinas.
- iii) Modelar matemáticamente los resultados obtenidos en los diferentes sistemas.
- iv) Evaluar la vida útil de las carnes tratadas con los sistemas de preservación estudiados en el punto i) en términos de aceptabilidad sensorial, color y estabilidad microbiana.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aceites esenciales y ácido láctico

Para el presente estudio se utilizaron aceites de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), eugenol (*Eugenia aromatica*) y orégano (*Origanum vulgare* subsp. Hirtum) con rangos de densidad de 0,893 - 0,916; 0,935 - 0,960 y 1,038 - 1,060 g/mL respectivamente, obtenidos en el mercado farmacéutico (Givaudan S.A.).

Adicionalmente, con el fin de aumentar la inhibición del desarrollo microbiano se utilizó ácido láctico ($C_3H_6O_3$) con concentración 87,5% P/P y PM 90,08 g/mol (Lab. Anedra).

3.2. Cepas utilizadas y preparación del inóculo

Se trabajó con microorganismos alteradores y patógenos, que pueden encontrarse comúnmente en las carnes, tales como cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Salmonella* spp ATCC 18684 provistas por el laboratorio de microbiología del CIDCA.

Para la preparación del inóculo, se partió de un cultivo puro de cada microorganismo en agar nutritivo incubado previamente a 37 °C durante 48 horas. Seguidamente se preparó una suspensión microbiana tomando con un ansa estéril entre 5 y 7 colonias de cada cultivo en 5 ml de solución fisiológica comparándola con el patrón de turbidez al 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

3.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada agente microbiano

3.3.1 Preparación de los Agentes antimicrobianos

La CMI corresponde a la menor concentración del aceite esencial capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento visible del microorganismo (Stepanovic y col., 2003).

Con el fin de determinar los valores de las CMI de los aceites para las distintas suspensiones bacterianas, se prepararon diluciones seriadas decimales de los aceites de estudio (romero, eugenol y orégano) en propilenglicol (Biopack Lab.), usado como solvente. Dicho solvente ha sido utilizado previamente para colorantes alimenticios,

antioxidantes y preparados de aceites esenciales y aromas, el mismo no interviene como inhibidor de microorganismos (Ortuño, 2006).

Por otro lado, se preparó ácido láctico en dilución 1/100 en peptona 0,1% estéril con el objeto de evaluar su efecto antimicrobiano individualmente.

3.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en forma individual

Este ensayo se realizó a través del método de microdilución en caldo para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias que crecen en condiciones aerobias (NCCLS, 2000).

Para su estimación, se prepararon tubos con diluciones decimales de cada aceite en propilenglicol (solvente). Posteriormente, a partir de la dilución de 1,00%V/V se realizaron diluciones seriadas al medio (1:2) adicionando 500 µL de cada dilución a 500 µL de caldo Mueller Hinton. Además, se preparó un tubo con ácido láctico (0,87% V/V) para evaluar el efecto inhibitorio de individualmente sobre las bacterias en estudio.

Se añadieron a continuación, a cada tubo, 500 µL de los inóculos microbianos (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Salmonella* spp ATCC 18684) en ensayos separados ajustados previamente a una densidad óptica de 0,5 en la escala de McFarland.

Los intervalos de concentraciones resultaron de 0,25%, 0,125%, y 0,06% V/V para cada uno de los aceites.

Se incluyeron además, un control de esterilidad del medio y un control positivo de crecimiento, para cada uno de los microorganismos evaluados en 500 µL de caldo Mueller Hinton. Todos los tubos se incubaron a 35 °C en estufa durante 18 horas.

En todos los casos, la CMI se estimó como la menor concentración de los tubos que a simple vista inhibió completamente el crecimiento de los microorganismos estudiados.

A partir de los tubos donde no se observa crecimiento, se determinó la concentración bactericida mínima (CBM). Para su determinación, 10 µL de los tubos inoculados (sin crecimiento) se sembraron en placas con medio Agar Plate Count para *E. coli* y *Salmonella* spp las cuales se incubaron a 37 °C durante 48 hs. Para la CBM de *Staphylococcus aureus*

los tubos inoculados se sembraron en placas de agar Baird Parker e incubaron a 37 °C durante 48 hs.

3.3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de las mezclas de los diferentes aceites esenciales y mezclas de aceites esenciales con ácido láctico

Primeramente, se realizaron estudios mezclando los diferentes aceites con el fin de evaluar la posibilidad de una mayor acción antimicrobiana. De ésta manera, se preparó una dilución inicial de 1,00 %V/V de cada aceite con el disolvente propilenglicol. A partir de ésta, en un tubo vacío se añadieron 500 µL de cada dilución inicial en iguales proporciones resultando las mezclas de 500 µL romero - 500 µL eugenol, 500 µL orégano - 500 µL eugenol y 500 µL orégano - 500 µL romero. Posteriormente, a partir de éste, se realizaron diluciones seriadas al medio (1:2) adicionando 500 µL de cada mezcla a 500 µL de caldo Mueller Hinton. Se añadieron a continuación, a cada tubo, 500 µL de los inóculos microbianos (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Salmonella* spp ATCC 18684), en ensayos separados, ajustados previamente a una densidad óptica de 0,5 en la escala de MacFarland. Se incluyeron además, un control de esterilidad del medio, el cual consistió en incubar un tubo de 500 µL de caldo Mueller Hinton sin inóculo, donde no se observa crecimiento microbiano y un control positivo de crecimiento. Todos los tubos se incubaron a 35 °C en estufa durante 18 horas. La concentración inicial del ensayo fue de 0,25% V/V/ 0,25% V/V para cada mezcla de aceites (romero/eugenol; orégano/eugenol y orégano/romero).

Por otro lado, se preparó ácido láctico al 0,87% V/V con el objeto de evaluar su efecto antimicrobiano con las distintas concentraciones de aceites esenciales en forma de mezclas binarias. Dicha concentración de ácido láctico fue utilizada en estudios previos por Coll Cárdenas y col. (2005) sobre el desarrollo de *Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp. y *Escherichia coli* en un sistema modelo cárneo, demostrando el efecto antimicrobiano de este ácido sobre estos microorganismos.

Paralelamente, se preparó una dilución inicial de 1,00% V/V de cada aceite (eugenol, romero y orégano) con el disolvente propilenglicol y de ácido láctico al 0,87% V/V. A partir de ésta se realizaron diluciones seriadas al medio (1:2) adicionando 500 µL a 500 µL de caldo Mueller Hinton.

A cada una de las mezclas, se añadieron a continuación, a cada tubo, 500 μ L de los inóculos microbianos (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Salmonella* spp ATCC 18684), por separado, ajustados previamente a una densidad óptica de 0,5 en la escala de McFarland. Se incluyeron además, un control de esterilidad del medio y un control positivo de crecimiento. Todos los tubos se incubaron a 35 °C en estufa durante 18 horas.

Las mezclas en estudio resultantes fueron: láctico/eugenol; láctico/orégano y láctico/romero. La concentración inicial de la mezcla de láctico/aceite esencial fue de 0,21 % V/V/ 0, 25% V/V.

También se realizaron las determinaciones de las CMI correspondientes. La interpretación de los resultados, se facilitó tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos usados como control (García y col., 2002).

3.3.4 Determinación de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI) y el Índice de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (ICFI)

Con el fin de seleccionar la mejor combinación de aceite esencial y ácido láctico, con acción antimicrobiana, se calcularon las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI) y el Índice de la misma a efectos de evaluar el efecto sinergista, aditivo o antagonístico de las mezclas binarias ensayadas. El efecto aditivo, ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto no aumenta ni disminuye por la presencia de otro agente. El sinergismo se refiere al incremento de la actividad antimicrobiana de un primer agente ante la presencia del segundo. Por último, el antagonismo ocurre cuando la actividad antimicrobiana de un compuesto se reduce con la presencia de un segundo agente antimicrobiano (Davidson y Parrish, 1989).

Los valores de CFI y el índice CFI, se obtuvieron a partir de los siguientes cálculos:

$$CFI_A = (\text{CMI de A en presencia de B}) / (\text{CMI de A individualmente})$$

$$CFI_B = (\text{CMI de B en presencia de A}) / (\text{CMI de B individualmente})$$

$$\text{Índice CFI} = CFI_A + CFI_B$$

A partir del valor del índice CFI, se determinó el efecto de las mezclas binarias de los aceites como antimicrobianos de la siguiente manera (Goñi y col., 2009):

Mezcla sinérgica (con resultados menores o iguales a 0,5)

Mezcla aditiva (0,5 - 0,75)

Sin ningún efecto (0,76 - 2,0)

Mezcla antagónica (mayor o igual a 2,0)

3.4. Estudios en el músculo cárneo

Se trabajó con carne bovina, extraída de novillos clasificados como regulares livianos tipo U2 grado de acuerdo a la Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario (peso promedio de la res 240 Kg), por Resolución 437 del 7 de julio de 2009 con un tiempo postmortem de 48 hs a 5 °C.

El músculo seleccionado para el estudio fue *semitendinoso* (corte conocido como peceto), adquirido en el comercio local. La elección del músculo bovino se debió a que éste presenta generalmente un pH de 5,6 en condiciones naturales. El pH de las muestras cárnicas se determinó mediante un peachímetro de punción pH/mv/temp Meter 6171L.

3.4.1. Preparación de las muestras: Adición de antimicrobianos individualmente y en mezclas

A efectos de evaluar el efecto de los antimicrobianos sobre la flora alteradora naturalmente presente las muestras de carne, se siguió el siguiente procedimiento:

Se trabajó con 10 g de muestras de carne las que fueron tratadas asépticamente con alcohol 70 ° y flameadas con fuego directo para esterilizar la cara superficial.

Luego, se extrajo con bisturí estéril, la primera capa superficial de contacto, considerada de mayor carga microbiana, de aproximadamente 1 cm de espesor (Coll Cárdenas, 2005).

Para la preparación de los compuestos antimicrobianos, se tuvo en consideración la CMI de cada uno de los aceites (romero, eugenol y orégano) de manera individual. El rango de la CMI para cada compuesto varió entre 0,03% V/V hasta 0,25% V/V.

Adicionalmente, a partir de los resultados microbiológicos obtenidos empleando las mezclas binarias se seleccionaron las que presentaron efecto antimicrobiano con valores de

CMI inferiores a los utilizados de manera individual (mezclas entre los tres aceites y mezcla de aceites con el ácido láctico). Los tratamientos seleccionados para el estudio se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos antimicrobianos seleccionados para su Estudio

1.	Aceite esencial romero a una concentración correspondiente al valor de CMI *
2	Aceite esencial eugenol a una concentración correspondiente al valor de CMI*
3	Aceite esencial orégano a una concentración correspondiente al valor de CMI*
4	Mezcla binaria de aceites esenciales**
5	Mezcla de ácido láctico (0,87% V/V) con aceite esencial seleccionado***
6	Ácido láctico (0,87% V/V) adicionado de forma individual

* Aceite esencial con valor de CMI hallada en los estudios de determinación de la CMI de cada agente microbiano.

** Mezcla obtenida en los ensayos previos de determinación de la actividad antimicrobiana de aceites en mezclas binarias de aceites que presentó una CIM de inferior.

*** Mezcla obtenida en los ensayos previos de determinación de la actividad antimicrobiana de aceites en mezclas binarias de aceites y ácido láctico que presentó una CIM de inferior.

A cada muestra de carne (10 g) se le adicionó 1 mL de cada solución de antimicrobiano cubriendo toda la superficie. Otras muestras sin tratar fueron consideradas como control. Las muestras tratadas y sin tratar se colocaron en placas de Petri cerradas y estériles y se almacenaron en cámaras frigoríficas a temperatura controlada de 4 °C durante dos semanas (Hao, 1997).

3.4.2 Análisis microbiológico

La cinética de crecimiento de la flora microbiana alteradora de carnes bovinas fue determinada en las muestras cárnicas almacenadas a 4 °C tratadas y control. Para ello, a diferentes tiempos de almacenamiento se tomaron 10 g de muestras de carne en forma estéril, las que se colocaron en bolsas estériles para luego añadir 90 ml de agua peptonada al 0,1% estéril y someterlas a homogeneización en un Stomacher 400 (1 minuto a velocidad media).

Luego, se tomaron alícuotas de 1 mL y se realizaron diluciones seriadas en tubos con 9 mL de peptona 0,1%. 1 mL de las diluciones necesarias se sembraron en placas de Petri estériles adicionando 10 mL de Agar Plate Count (PCA), fundido y atemperado a 45 - 50 °C (Método Pour Plate Procedure, AOAC (1984)). Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 hs y luego se realizaron los recuentos de los microorganismos heterótrofos mesófilos totales.

El recuento de Enterobacteriaceae, se realizó en Agar Cristal Violeta Rojo Neutro Bilis sembrando 100 µL de las diferentes diluciones realizadas en agua peptona 0,1% para luego ser incubadas a 37 °C durante 48 hs.

El recuento de microorganismos psicrótrofos se realizó sembrando 1 mL en placas al que se le agregó Agar Plate Count, con incubación a 10 °C durante 7 días (Giannuzzi y col., 1998).

En todos los casos, se realizó el recuento microbiano correspondiente mediante un cuenta colonias electrónico adecuado. Los resultados se expresaron como Log (UFC/g) (Unidades Formadoras de colonia por gramo).

3.5 Modelado matemático

Los modelos matemáticos pueden ser empleados para predecir los efectos sobre la vida útil de los alimentos en base a diferentes combinaciones tiempo - temperatura durante su producción y distribución. La validación de estos modelos en un alimento debe incluir estudios iniciales en medio de cultivo con influencia de factores limitantes y ensayos en la matriz alimentaria. A partir de los resultados obtenidos se puede predecir el comportamiento de los microorganismos de interés contenidos en el alimento (Whiting y Masana, 1994; Coll Cárdenas, 2005).

Uno de los modelos más recomendados es la ecuación modificada de Gompertz (Gibson y Roberts, 1989; Zwietering y col., 1990), cuya expresión matemática es:

$$\text{Log } N = a + c \cdot \exp(-\exp(-b(t - m)))$$

Ecuación 1

Donde: **Log N** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos [Log (UFC/g)] al tiempo **t**, dado en días.

a es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo decrece indefinidamente (aproximadamente equivale al Log de los niveles iniciales de bacterias) [Log (UFC/g)].

c es el Log de los recuentos asintóticos cuando el tiempo se incrementa indefinidamente (es el número de ciclos Log de crecimiento) [Log (UFC/g)].

m es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento [días].

b es la velocidad de crecimiento relativa al tiempo **m** [días⁻¹].

De estos parámetros, se derivan la velocidad específica de crecimiento ($\mu = b.c/e$) [Log (UFC/g)/días], (con $e = 2,7182$).

La duración de la fase de latencia ($LPD = m - 1/b$) [días] y la máxima densidad poblacional microbiana bajo condiciones particulares ($MPD = a + c$) [Log UFC/g].

Estos parámetros son específicos para cada microorganismo y su ambiente.

La ecuación fue ajustada a los datos del desarrollo microbiano mediante una regresión no lineal con el programa Sigma Plot versión 11.0 (Systat, Inc). El programa ajusta los datos a la curva, o sea que calcula los parámetros de acuerdo a un determinado criterio. Los parámetros **a**, **c**, **b** y **m** son estimados, para obtener un modelo matemático completo del cual, una curva de crecimiento podría ser predicha para cualquier combinación de condiciones dentro de los límites del experimento. Otros parámetros de interés como la fase de latencia, pueden derivarse entonces de la curva de predicción (Chang, 1998; Coll Cárdenas, 2005).

En otros casos, también fue factible utilizar el modelo de regresión lineal, principalmente cuando el número de microorganismos en el alimento se mantuvo constante o decreció durante el almacenamiento.

La ecuación, en ese caso se expresa como:

$\text{Log } N_t = \log N_0 + a t$	Ecuación 2
------------------------------------	------------

Dónde: **Log N_t** es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos finales [Log (UFC/g)] al cabo del tiempo **t**, dado en [días].

Log N₀ es el logaritmo decimal de los recuentos microbianos iniciales [Log (UFC/g)].

a corresponde a la pendiente de la regresión $[(\text{UFC/g}) \text{ días}^{-1}]$ que es negativa cuando hay efecto bactericida (Whiting y Masana, 1994).

Se consideró que los microorganismos estaban en fase de latencia (50 días) si la pendiente adquiría un valor menor a $0,01 (\text{UFC/g})^{-1} \text{ días}^{-1}$, o si la diferencia entre los recuentos finales y los iniciales eran menores a 0,5 ciclos logarítmicos. Se calculó la fase de latencia como el tiempo requerido a partir del cual el desarrollo microbiano aumentó 0,5 Log del nivel inicial ($\text{LPD} = 0,5/ a$) (Coll Cárdenas, 2005).

3.6. Determinación de la vida útil de las carnes tratadas con mezclas de antimicrobianos

La vida útil de la carne vacuna se relaciona directamente con la calidad bacteriológica y depende de distintos factores, relacionados al sacrificio del animal y a su comercialización, sin olvidar su crianza en vida. En las distintas etapas de producción se generan incrementos o disminuciones de la microbiota existente en las canales (Pascual y Calderón, 1999). Para ello se definió la vida útil del producto es una combinación de diferentes atributos:

Aspectos microbiológicos, aspectos de aceptabilidad en el color y en el sabor.

La vida útil de la carne, desde el punto de vista microbiológico puede definirse como el tiempo de almacenamiento refrigerado al cual el producto alcanza recuentos microbianos de 10^6 UFC/g sin la presencia de microorganismos patógenos (Giannuzzi y Zaritzky, 1991).

3.6.1. Evaluación de color

Se evaluaron los cambios de color superficial sobre las muestras de carne tratadas con los diferentes tratamientos antimicrobianos (Tabla 2). A cada muestra de carne (10 g) se adicionó 1 mL de cada uno de los aceites y/o soluciones descriptos en la Tabla 2, cubriendo toda la superficie. Otras muestras sin tratar fueron consideradas como control.

Las muestras de carne tratadas, fueron colocadas en placas de Petri cubiertas y estériles, y almacenadas inmediatamente en cámaras frigoríficas a temperaturas controladas de 4°C durante dos semanas (Hao, 1997).

A distintos tiempos de almacenamiento a 4°C , se tomaron muestras y se realizaron las determinaciones de color con un colorímetro Minolta CR300 (NJ, USA). Se midió el color, colocando el colorímetro tri estímulo sobre un área de 8 mm de diámetro sobre la superficie

de cada muestra de carne. El equipo fue calibrado usando una placa de color blanco estándar (Placa para calibración estándar, Y092,6, x00,3136, y00,3196). Se describió el color siguiendo las siguientes coordenadas de acuerdo a la escala CIELab (CIE, 1978): Luminosidad (L^* : 100 blanco, 0 negro), abundancia de color rojo (a^* : \pm rojo - verde) y abundancia de color amarillo (b^* : \pm amarillo - azul).

Con el objetivo de monitorear los cambios de color de la carne tratada durante la etapa de almacenamiento, el cambio de color total (ΔE) fue calculado a partir de la siguiente expresión (CIE, 1978):

$\Delta E = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{1/2}$	Ecuación 3
--	------------

L_0^* , a_0^* y b_0^* indican las lecturas en el tiempo cero y L^* , a^* y b^* indican las lecturas al final del tiempo de almacenamiento.

El color de la superficie de la carne y los cambios superficiales durante el almacenamiento, son afectados por la temperatura, el tiempo y los tratamientos aplicados al músculo cárneo, así, el menor valor de ΔE será el más aceptable (Katarzyna y col., 2015).

3.7. Análisis sensorial

3.7.1 Preparación de las muestras

Se pesaron muestras de 10 g carne fresca bovina (músculo *semitendinoso*). Se adicionó a cada muestra 1 mL de los agentes antimicrobianos (Tabla 2) cubriendo toda la superficie, que se dispersaron adecuadamente. Inmediatamente del agregado de los aceites, se sometieron a cocción a 70 °C durante 10 minutos, a la plancha y sin ningún tipo de condimento.

Otras muestras sin tratamientos antimicrobianos y sometidos a cocción, fueron consideradas como control.

3.7.2 Panel sensorial

Los ensayos de discriminación sensorial se realizaron utilizando la prueba de evaluación de aceptabilidad por atributos, para establecer las diferencias entre los distintos tratamientos, también, se determinaron los aspectos de aceptación de las muestras tratadas.

El estudio se realizó mediante un panel no entrenado compuesto por 20 personas, que calificaron las muestras en términos de sabor, textura, color y aceptabilidad global utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1: no me gusta nada - 9: me gusta mucho). Se preparó un total de 140 muestras (7 tratamientos para 20 personas). Se consideró un valor de entre 6 y 7 como aceptabilidad de la muestra por el panel sensorial.

3.8. Análisis Estadístico

Con el fin de establecer si existía diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tratamientos antimicrobianos previamente descritos, (en términos de efecto antimicrobiano, cambios de color y evaluación sensorial) se utilizó el análisis de la varianza ANOVA (SYSTAT, INC) y el test de comparación de acuerdo a la tabla de diferencias significativas de Fisher (LSD); fueron aplicados con un nivel de significación de 0,05 y 0,01. Para su realización se utilizó el programa estadístico computacional SYSTAT (SYSTAT Inc., versión 5.0, 2008).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de romero, eugenol y orégano de forma individual sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*

El caldo Mueller Hinton se utiliza habitualmente en microbiología para la determinación de la CMI, comúnmente de antibióticos. Además, es un medio de cultivo frecuentemente utilizado para hallar bacterias aerobias y anaerobias facultativas en alimentos y en material clínico. Está recomendado por la FDA y la OMS y permite que crezcan idealmente la mayoría de los patógenos. Su contenido de infusión de carne y caseína proporcionan nitrógeno, vitaminas, carbono, sulfuros y aminoácidos. El almidón es ideal para la absorción de metabolitos tóxicos (OMS, 2003).

Los resultados de la CMI de los aceites esenciales ensayados sobre el crecimiento de microorganismos de interés alimentario se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria de aceites de romero, eugenol y orégano ensayadas en *E. coli*, *Salmonella* y *S. aureus*

Cepas Bacterianas	CMI (%V/V)		
	Romero	Eugenol	Orégano
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,25	0,25	0,12
<i>Salmonella</i> ATCC 18684	0,25	0,12	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	0,12	0,12	0,25

Para *E. coli*, el orégano fue el aceite más efectivo; *Salmonella* spp. fue más sensible al eugenol; y para *S. aureus*, romero y eugenol fueron los aceites más efectivos en su inhibición con CMI de 0,25%V/V.

A partir de las muestras donde no se observa crecimiento, se realizaron subcultivos en placas en medios Agar Plate Count y Baird Parker para determinar la CBM. La actividad de los aceites esenciales, sobre las bacterias estudiadas fue significativa, con CMI que coincidieron con CBM en todos los casos. Esto hace destacar el efecto antimicrobiano de los aceites sobre los microorganismos en estudio. La CBM de romero, eugenol y orégano, se encontró en rangos de 0,12 - 0,25% V/V de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3.

Los aceites esenciales contienen compuestos responsables de su actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Lambert y col., 2001). La membrana celular de las bacterias Gram negativas, contiene lipopolisacáridos, los cuales ayudan a evitar la acumulación de aceites en la membrana celular. Por el contrario, las bacterias Gram positivas, poseen una membrana celular simple (Bezi y col., 2003). Basándonos en esta teoría observamos que, *S. aureus* fue más sensible a dos de los tres aceites esenciales evaluados en el estudio, en comparación con los otros microorganismos. De igual forma, nuestros resultados coinciden con lo informado por Rosato y col. (2007) quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de compuestos principales de aceites esenciales de orégano y romero como el citronelol, eucaliptol, geraniol, timol y triacetina mezclados con antibióticos como norfloxacin sobre *S. aureus* y *E. coli*, siendo más sensible *S. aureus* a los tratamientos del estudio. De esta manera, se puede inferir que la sensibilidad de *S. aureus* a los tratamientos, está estrechamente relacionada con las características de la membrana celular externa, la cual permite más fácilmente la entrada de los aceites esenciales. Igualmente, y con respecto a las cepas en estudio de *E. coli* y *Salmonella*, podría decirse que a pesar de presentar valores de CMI diferentes (orégano y eugenol), los aceites esenciales presentaron un efecto antimicrobiano en estos dos microorganismos.

Los resultados presentados en este estudio coinciden con investigaciones previas que han demostrado la eficacia de diversos aceites esenciales sobre el desarrollo de microorganismos patógenos. Para ejemplificar, se destaca un estudio realizado por Oussalah y col. (2007) quienes utilizaron veintiocho aceites esenciales para evaluar su efecto antimicrobiano sobre *E. coli* O:157H:7, *S. aureus*, *S. typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. Entre los antimicrobianos utilizados se destacan las especies de *Eugenia aromatica* (eugenol) y *Origanum vulgare* (orégano), donde se evidenció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los cuatro microorganismos. De todos los tratamientos en el estudio citado, el aceite esencial más efectivo fue el orégano, el cual presentó una CMI de 0,25% V/V para *E. coli* O:157H:7 y 0,50% V/V para *S. typhimurium*. Estos resultados coinciden con el rango de concentración utilizado en el presente trabajo. Se sugiere en el estudio mencionado que el orégano y sus componentes principales como el carvacrol y el timol poseen características atribuibles al efecto antimicrobiano sobre los microorganismos en estudio, especialmente especies de *Origanum* que contienen

concentraciones mayores de carvacrol. Estos resultados coinciden con el rango de CMI hallados en nuestras experiencias, lo cual demuestra que la utilización de estos es favorable para la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. El aceite de orégano, posee principalmente porcentajes altos de carvacrol (40%) y de timol (11%), también contiene compuestos fenólicos (Stashenko, 2010). Asimismo, Hammer y col., (1999) evaluaron el efecto del aceite de orégano sobre el desarrollo de *S. aureus* y *S. typhimurium* e informaron valores de CMI de 0,25% V/V y 0,50% V/V, respectivamente.

En las distintas publicaciones consultadas, algunos investigadores reportaron valores de CMI que difieren de los valores exactos hallados en la presente investigación, esto puede atribuirse al método utilizado, valores diferentes de concentración de compuestos naturales presentes en los aceites esenciales, presencia de distintos grupos funcionales, configuración estructural, y posiblemente puede existir una interacción sinérgica entre los componentes de cada aceite, lo cual también depende del tipo de extracción (Oussalah y col., 2007; Sakkas y Papadopoulou, 2017).

Investigadores como Xiao-Fang y col. (2018) conformaron el efecto antimicrobiano del clavo de olor aplicado en cepas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis* y *S. aureus* ensayando un rango de concentraciones (0,5 - 1 mg/mL). El efecto antimicrobiano se puede atribuir a la composición química, los grupos funcionales (alcoholes, fenoles, aldehídos) y a efectos sinérgicos entre los diferentes componentes (Oussalah y col., 2007).

Otros estudios realizados por Gill y Holly (2006) sugirieron que la acción antimicrobiana del eugenol, se desarrolla a través de daños sobre la membrana plasmática bacteriana, la cual incrementa su permeabilidad no específica. Adicionalmente a este fenómeno, Pandima y col. (2010) evaluaron el efecto antimicrobiano del eugenol y su mecanismo de acción bactericida sobre *S. typhi*, ensayando un rango de concentraciones (0,05% V/V - 10,00% V/V) para comprobar cuál de ellas producía mayor daño a la membrana celular, observando que a una concentración de 1,00% V/V, la membrana celular comenzó a verse alterada en un alto porcentaje (95%). Los valores de CMI de eugenol que se encontraron en el presente trabajo difieren de los obtenidos en los estudios mencionados, ya que en nuestro caso tan sólo con 0,12% V/V de eugenol, las células de *Salmonella* spp. y de *S. aureus* se vieron inhibidas en su crecimiento. Las diferencias en los valores de CMI, con respecto al estudio

citado, pueden deberse, por ejemplo a las diferencias en las cepas bacterianas utilizadas y las metodologías de obtención del aceite.

En relación al aceite de romero, el cual contiene fracciones no volátiles como el carnosol (10%) y ácido romérico (3%), responsables de su actividad antimicrobiana (Cuvelier y col., 1999), puede decirse que los resultados obtenidos concuerdan con el efecto antimicrobiano encontrado en estudios publicados por diversos investigadores. Por ejemplo, Jarrar y col. (2010) probaron el aceite esencial de romero en cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos (metecilina), encontrando una CMI de 0,39% V/V, siendo esta mayor a la hallada en nuestro estudio (0,12%V/V). Sin embargo, la diferencia en los valores puede deberse a la cepa que se utilizó en el estudio referencia, ya que al ser una cepa multiresistente, presenta una configuración genética especial atribuible a esa condición. Asimismo, los autores aseguran que la composición del romero y su efecto de perturbación de la membrana citoplasmática permitirían la entrada de un compuesto con efecto destructivo para la célula. En cuanto al ácido láctico, la CMI fue de 0,87% V/V, coincidiendo con resultados de investigaciones previas del equipo de investigación, donde Coll Cárdenas (2005) evaluó el efecto antimicrobiano del ácido láctico en *Klebsiella* sp, *E. coli* y *Pseudomonas* sp.

4.2 Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de aceites esenciales sobre microorganismos de interés alimentario:

Para la preservación de alimentos, se ha venido implementando desde hace tiempo el uso de antimicrobianos naturales, sin embargo, la mayoría de los estudios se han enfocado en analizarlos de manera individual (Busta y Foegeding, 1983). Por ello, el interés en estudiar mezclas de antimicrobianos ha ido en aumento. De acuerdo a esto y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se propuso un ensayo basado en realizar mezclas binarias de estos aceites y así establecer su efecto y actividad como antimicrobianos.

Se probaron tres mezclas de aceites binarias en distintas concentraciones (romero/eugenol; orégano/eugenol y orégano/romero) según lo indicado en la Sección 3.3 de Materiales y Métodos. Los resultados de las CMI de las mezclas binarias de aceites esenciales sobre microorganismos patógenos se presentan en la Tabla 4.

Al analizar los valores de CMI (Tabla 4) se puede observar que tanto para *E. coli* como para *S. aureus*, las tres mezclas presentaron igual efectividad (CMI de 0,06% V/V), en tanto *Salmonella* spp. fue más sensible a la mezcla de orégano - romero (CMI de 0,03% V/V).

A partir de los tubos donde no se observó crecimiento se determinó la CBM, observándose valores equivalentes a las CMI. Esto hace destacar el efecto bactericida de las tres mezclas de aceites sobre los microorganismos en estudio. Los valores de CBM para las mezclas romero - eugenol, orégano - eugenol y orégano - romero, abarcaron un rango de 0,03 - 0,06% V/V, de acuerdo con lo descrito en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de CMI y CMB de mezclas binarias de antimicrobianos ensayadas en *E. coli*, *Salmonella* y *S. aureus*

Mezclas de aceites esenciales	CMI y CBM (% V/V)		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> spp ATCC 18684	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P
Romero /Eugenol	0,06/0,06	0,06/0,06	0,06/0,06
Orégano /Eugenol	0,06/0,06	0,06/0,06	0,06/0,06
Orégano /Romero	0,06/0,06	0,03/0,03	0,06/0,06

Como se puede observar, los valores de CMI de los aceites evaluados en forma individual (Tabla 3) son superiores a los hallados en las mezclas binarias (Tabla 4). Este resultado sugiere que el uso de mezclas binarias genera un efecto antimicrobiano más eficaz, ya que en general se encontraron valores de CMI más reducidos.

Es importante reconocer el efecto sinérgico de las mezclas binarias de antimicrobianos naturales, ya que éstas pueden contribuir a la reducción de costos en el área de preservación de alimentos, disminuyendo también la toxicidad de los mismos. Por ello y teniendo en cuenta que los aceites esenciales son mezclas complejas de varias moléculas, es posible que una de ellas sobresalga si su efecto biológico es consecuencia del sinergismo o de la existencia de moléculas principales presentes en altos niveles (Ipek y col., 2005).

En general, las características biofísicas y biológicas de los aceites esenciales dependen de sus componentes, sin embargo su efecto antimicrobiano puede depender de la concentración de algunas de las moléculas contenidas en él. Las funciones sinérgicas de las

diversas moléculas de un aceite esencial, al igual que las contenidas en la mezcla binaria son determinantes para valorar los efectos de las mismas sobre los microorganismos patógenos (Franzios y col., 1997).

Los resultados presentados en esta investigación se asemejan con estudios previos donde explican la influencia del uso de mezclas de aceites esenciales para mejorar la eficacia del uso de antimicrobianos sobre microorganismos de interés alimentario. Por ejemplo, De Azeredo y col. (2011) utilizaron el aceite de orégano y romero en forma individual y en mezcla sobre bacterias patógenas (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas hydrophilla*) y cepas autóctonas asociadas a verduras mínimamente procesadas. Encontraron que la mezcla de aceites tuvo un mayor efecto antimicrobiano sobre los microorganismos patógenos, debido a la existencia de compuestos como el carvacrol (66,9 g/100 g) y 1,8 cineol (32,2 g/100 g) y además ejercen una mayor actividad antibacteriana en bajas concentraciones de orégano/romero (0,31/5µL/mL).

Por otra parte, al evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites de forma individual y en mezclas, existen varios factores que determinan su actividad sobre las células. Es importante tener en cuenta que existen compuestos específicos de los aceites esenciales que desempeñan un papel importante en la fijación en las paredes celulares y membranas, y en la distribución celular (Cal, 2006). Esta última característica es muy importante porque la distribución del aceite en la célula determina los diferentes tipos de reacciones de radicales producidos, dependiendo de su compartimentalización en la célula. Es por ello que para propósitos biológicos es ideal comenzar con el estudio de los aceites de forma individual primero y luego en mezclas, ya que el concepto de sinergia puede ser más significativo (Bakkali y col., 2008).

4.3 Actividad antimicrobiana de mezclas binarias de aceites esenciales y ácido láctico sobre microorganismos de interés alimentario:

Los ácidos débiles ejercen una preponderante acción inhibitoria sobre los microorganismos, tanto a partir de su forma disociada como de la sin disociar (Eklund, 1989).

El ácido láctico se utiliza ampliamente para el tratamiento de alimentos, lo que ha llevado a su amplia utilización como conservante de alimentos y agente antimicrobiano (Goncalves y col., 2005).

Las mezclas de aceites y ácido láctico fueron preparadas en iguales proporciones (0,50%/0,50%): láctico/eugenol; láctico/orégano y láctico/romero. En el presente estudio se determinaron los valores de CMI de las mezclas binarias de ácido láctico con los aceites de romero, eugenol y orégano, los que se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de mezclas de aceites con ácido láctico ensayadas en *E. coli*, *Salmonella* y *S. aureus*.

Cepas Bacterianas	CMI Mezclas (% V/V)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	A. Láctico 0,05 / Romero 0,06
	A. Láctico 0,05 / Eugenol 0,06
	A. Láctico 0,02 / Orégano 0,03
<i>Salmonella spp.</i> ATCC 18684	A. Láctico 0,05 / Romero 0,06
	A. Láctico 0,05 / Eugenol 0,06
	A. Láctico 0,02 / Orégano 0,03
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	A. Láctico 0,05 / Romero 0,06
	A. Láctico 0,05 /Eugenol 0,06
	A. Láctico 0,02 / Orégano 0,03

En esta investigación, se partió de una concentración de ácido láctico específica utilizada en estudios previos del grupo de trabajo (Coll Cárdenas y col., 2008) como agente antimicrobiano junto con distintas concentraciones de aceites esenciales. Terzi y Gucukoglu (2010) comprobaron el efecto inhibitorio del ácido láctico 1,00% V/V sobre *Vibrio parahaemolyticus* en carne de búfalo, encontrando un efecto inhibitorio importante

después de distintos periodos de incubación. De igual manera, Coll Cárdenas (2005), utilizó ácido láctico 87,5% P/P y PM 90,08 g/mol en dilución 1,00% de ácido láctico sobre el desarrollo de *Klebsiella* sp. en un sistema modelo cárneo, demostrando el efecto antimicrobiano de este ácido sobre dicho microorganismo.

A partir de los resultados obtenidos (Tabla 5), se puede inferir que el ácido láctico en mezcla con los tres aceites, ejerció acción inhibitoria sobre el desarrollo de las tres cepas bacterianas. Se destaca la mezcla binaria de ácido láctico - orégano (0,02/0,03% V/V), la cual resultó ser la más efectiva en comparación con las otras mezclas.

Las mezclas de láctico - romero y láctico - eugenol, ejercieron actividad antimicrobiana en la concentración de 0,05/0,06% V/V, respectivamente.

Diversos investigadores han evaluado el efecto inhibitorio de las mezclas de aceites esenciales y ácido láctico sobre otros microorganismos de interés alimentario. Así, Lin y col. (2005-a) utilizaron mezclas de aceites esenciales de orégano, arándano y ácido láctico sobre el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*. Primero evaluaron el efecto antimicrobiano de las mezclas de aceites, y luego incorporaron al ensayo el ácido láctico, siendo éste último más eficaz, considerando como barrera múltiple. La concentración ideal para la inhibición del microorganismo en estudio fue de 50% P/P /50% P/P, en presencia de ácido láctico 2%, disminuyendo en 2,5 Log el recuento microbiano en comparación con la mezcla de los aceites de orégano y arándano. Esta reducción microbiana se puede deber a los grupos fenólicos de los aceites que pueden dañar las membranas, haciendo que sean más sensibles a la hiperacidificación del medio. Así, la sensibilidad de *V. parahaemolyticus* al ácido láctico aumenta en combinación con fotoquímicos fenólicos.

De acuerdo a los resultados anteriores, se puede decir que las mezclas de aceites esenciales con un preservador de seguridad tal como es el ácido láctico, pueden convertirse en una herramienta de valiosa utilidad para la preservación de alimentos en forma de aditivos. Esta alternativa puede ayudar a la prevención de contaminación alimentaria por microorganismos patógenos o por microorganismos alterantes en varias matrices alimentarias.

4.3.1 Determinación de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI) y el índice de la Concentración Fraccionaria Inhibitoria (CFI).

La interpretación de resultados en la evaluación de dos o más agentes antimicrobianos se basa principalmente en el cálculo de las concentraciones fraccionales inhibitorias (CFI). La CFI se define como la concentración de un agente antimicrobiano (expresado como una fracción de su CMI) requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo cuando se combina con una concentración conocida de otro agente. Sin embargo, los estudios de mezclas de agentes antimicrobianos también tienen el propósito de determinar el tipo de interacción entre los agentes que se combinan.

De acuerdo a lo descrito en materiales y métodos, se calculó la CFI para cada mezcla de agentes antimicrobianos en estudio. Luego, se determinó el índice CFI para cada mezcla (Tabla 6). Estos resultados se obtuvieron a partir de los siguientes cálculos:

CFI del agente antimicrobiano 1= (CMI de agente 1 en presencia de 2) / (CMI de 1 individualmente)

CFI del agente antimicrobiano 2= (CMI de 2 en presencia de 1) / (CMI de 2 individualmente)

Asimismo se calculó el índice CFI:

$$CFI_{Mezcla\ 1+2} = CFI_1 + CFI_2$$

A partir del valor del índice CFI, se determinó el efecto de las mezclas binarias. Estas interacciones pueden ser de tipo sinérgico, aditivo, sin efecto y antagónico.

Cuando una mezcla es sinérgica el índice CFI arroja resultados menores o iguales a 0,50; el de la mezcla aditiva es de 0,50 a 0,75; el de la mezcla sin efecto es de 0,76 - 2,00 y el valor correspondiente a la antagónica es mayor o igual a 2,00 (Barry, 1976; Goñi y col., 2009).

Los resultados obtenidos en nuestras experiencias se presentan en la Tabla 6 a partir de los cálculos formulados en la sección 4.3.1.

Tabla 6. Índice de Concentraciones Fraccionales Inhibitorias sobre la inhibición de crecimiento de las cepas de *E. coli*, *Salmonella* sp y *Staphylococcus aureus*

Mezclas	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> sp ATCC 18684	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P
Romero/ Eugenol	0,48	0,74	1,00
Orégano/Eugenol	0,74	0,74	0,74
Romero/Orégano	0,74	0,24	0,74
Láctico /Romero	0,29	0,29	0,55
Láctico/ Eugenol	0,29	0,55	0,55
Láctico/ Orégano	0,27	0,14	0,14

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 6) se pueden observar distintas respuestas de los microorganismos al agregado de las mezclas de antimicrobianos.

Es importante enfatizar en el efecto sinérgico (índice CFI \leq a 0,50) de distintas mezclas, la mayoría de ellas en combinación con ácido láctico, destacándose la mezcla de láctico - orégano sobre cepas de *Salmonella* spp. y *S. aureus* (0,14). De igual manera, el mismo efecto se reflejó sobre la cepa de *Salmonella* spp. cuando se expuso a la mezcla binaria de romero - orégano. Adicionalmente se observa que las tres mezclas de ácido láctico con los aceites esenciales, resultaron ser sinérgicas para *E. coli*. La única mezcla binaria que no ejerció ninguna interacción (índice CFI =0,76 - 2,00) sobre *S. aureus* fue la mezcla de romero - eugenol.

Algunos de nuestros resultados coinciden con investigaciones realizadas por Goñi y col. (2009) quienes ensayaron una mezcla de canela y eugenol sobre el crecimiento de bacterias como *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, encontrando efecto aditivo (índice CFI=1,1) sobre *E. coli*, y *S. aureus* (índice CFI=1,2) y sinérgico (índice CFI=0,5) sobre *L. monocytogenes*. Igualmente, García y col. (2010), evaluaron el efecto bactericida de mezclas de carvacrol, timol y eugenol sobre *Listeria innocua*. Al ensayar distintas concentraciones de antimicrobianos y gracias a la determinación del índice CFI, sus resultados resaltaron el efecto sinérgico de las mezclas (0,5).

El efecto sinérgico en mezclas de antimicrobianos definidos por el cálculo de la CFI, fueron utilizados por otros autores. Por ejemplo, Yap y col. (2013) investigaron la relación entre

aceites esenciales comercialmente disponibles en mezclas binarias con antibióticos betalactámicos en la determinación del efecto antibacteriano en bacterias resistentes a múltiples antibióticos, entre ellas, *E. coli*. Probaron 35 mezclas de antibióticos y aceites esenciales, donde, cuatro mostraron efecto sinérgico (índice CFI $\leq 0,5$) y 31 de las mezclas no mostraron ningún efecto. Utilizaron aceites esenciales de eugenol, orégano, lavanda, árbol de té y menta. Como antibióticos utilizaron ampicilina, carbenicilina, cefazolina, cefuroxima, ceftazidima, piperacilina y meropenem. Las mezclas que ejercieron efecto sinérgico sobre *E. coli* fueron: piperacilina/aceite de eugenol, piperacilina/aceites de lavanda, piperacilina/aceite de menta y meropenem/aceite de menta. Los autores concluyeron que el eugenol al tener la capacidad de penetrar la membrana celular puede ayudar a la absorción del antibiótico promoviendo el efecto sinergista sobre la bacteria en estudio y que el aceite esencial promueve la disminución sustancial de la CMI de la piperacilina. De esta manera, el uso de la CFI es de gran utilidad para considerar aplicaciones de los aceites esenciales en tratamientos contra bacterias resistentes a diversos antibióticos beta - lactámicos.

Otros autores (De Medeiros Barbosa y col., 2016) demostraron el efecto sinérgico del aceite esencial de orégano y romero sobre el crecimiento de *S. enteritidis*, presentando un índice CFI menor a 0,5. Ésta interacción sinérgica ocurre cuando se combinan concentraciones sub inhibitorias lo que produce un mayor efecto inhibitorio contra los microorganismos en estudio en comparación al uso de antimicrobianos probados de forma individual (Oliveira y col., 2010).

Un estudio realizado por De Barros y col. (2012) demostró el efecto sinérgico de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. con ácido láctico sobre el crecimiento de *S. aureus*, presentándose un índice CFI de 0,50, sin embargo, el valor de nuestro estudio fue menor al indicado por este autor (0,14). Es posible que los aceites esenciales en combinación con compuestos aromáticos identificados por su efecto antimicrobiano, como el timol, produzcan un efecto sinérgico de estas mezclas sobre microorganismos patógenos (Nazer y col., 2005). Otros investigadores han desarrollado ensayos con mezclas de aceites esenciales como romero y orégano, sobre *Aeromonas hydrophila*, *L. monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens* determinándose un efecto sinérgico y con un índice CFI resultante de 0,5 (De Azeredo y col., 2011). Otros autores, también probaron mezclas de

carvacrol y 1,8 cineol resultando un índice CFI de 0,25 (Oliveira y col., 2015), confirmando que los efectos antimicrobianos de las mezclas romero - orégano se ven mejorados gracias a las diferentes estructuras químicas de los componentes principales (carvacrol/timol y eucaliptol, respectivamente). Estas diferencias fueron predichas en distintas interacciones con las estructuras de los microorganismos blanco, principalmente relacionados con la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en estudio.

El modo de acción de los agentes antimicrobianos depende del tipo de microorganismo, sin embargo en el caso de los aceites esenciales, el daño se asocia principalmente a la membrana celular. Sus constituyentes químicos se caracterizan por ser hidrofóbicos y se acumulan en ambientes ricos en lípidos dentro de las membranas, causando daño estructural y funcional (Honório y col., 2015). De igual manera, factores como la toxicidad están vinculados directamente a la hidrofobicidad (Cox y col., 2001). De acuerdo a lo anterior, los modos de acción específicos de todos los componentes que forman parte de los aceites esenciales que tienen propiedades antimicrobianas sobre microorganismos (en su metabolismo), todavía tienen que definirse con claridad, incluso cuando los compuestos antimicrobianos se usan de manera individual.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 6, las mezclas con efecto sinérgico, principalmente mezclas de láctico - aceites esenciales podrían considerarse como efectivas para el control de los microorganismos patógenos. A pesar de que no hay muchas investigaciones publicadas acerca del uso de mezclas entre ácidos orgánicos con compuestos antimicrobianos naturales como aceites esenciales extraídos de plantas y especias, los resultados de este trabajo podrían dar un enfoque interesante y prometedor para la optimización de la conservación de los alimentos, teniendo en cuenta la posible aceptación sensorial en matrices alimentarias, lo cual tendría que investigarse. Adicionalmente, se pueden combinar metodologías para estudiar de manera más eficiente el uso de antimicrobianos en alimentos. Por ejemplo, en la industria alimentaria la llamada tecnología de obstáculos sugiere que la combinación de varios factores de preservación de alimentos incluyendo físicos y químicos, pueden actuar de forma sinérgica, para inhibir o retardar el crecimiento microbiano, ya que hay más desafíos que el microorganismo debe superar para su supervivencia (León - Cruz y col., 2003).

Los resultados anteriores inicialmente muestran la efectividad de aceites ensayados individualmente y en mezclas de aceites y ácido láctico sobre el desarrollo microbiano de patógenos como *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella*. De acuerdo a este antecedente, cabría preguntarse si el uso de ácido láctico en combinación con aceites esenciales podría tener un efecto adecuado sobre el músculo cárneo y sobre la flora natural del mismo.

4.4 Estudios en el músculo cárneo

La carne bovina y sus productos derivados son de gran preocupación debido al gran potencial de riesgo de contaminación. Es por ello que ha crecido la necesidad de investigar e implementar técnicas de control sobre el desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes. Varios estudios proponen la combinación de agentes antimicrobianos solos o en mezclas, con temperaturas de refrigeración, indicando que pueden ser importantes para el control de enfermedades transmitidas por alimentos (Skandamis y Nychas, 2001).

4.4.1 Efecto antimicrobiano de aceites esenciales y ácido láctico añadidos de forma individual sobre el músculo cárneo

Luego de establecer los valores de CMI para los aceites de romero, eugenol, orégano y ácido láctico sobre cepas de *S. aureus*, *Salmonella* spp. y *E. coli* (Tabla 3), se evaluó el efecto antimicrobiano sobre el desarrollo de microorganismos alteradores comúnmente encontrados en carnes bovinas durante el almacenamiento refrigerado. En la Fig. 3. a, b y c, se presenta el crecimiento de microorganismos aerobios mesófilos (Fig. 3.a), coliformes (Fig. 3.b) y psicrótrofos (Fig. 3.c) en las muestras cárnicas con el agregado de aceites esenciales y ácido láctico y en las muestras sin tratar, control, almacenadas a 4 °C durante el tiempo que duró el tratamiento (15 días). Todos los tratamientos fueron analizados estadísticamente mediante el ANOVA correspondiente. Los resultados se detallan en el Anexo 1. Se observaron diferencias significativas entre los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales, coliformes y psicrótrofos de las muestras de carne con adición de los distintos tratamientos (ácido láctico, aceites de romero, orégano y eugenol) y las muestras sin tratar.

En la Figura 3.a, se observa la cinética de crecimiento de los microorganismos aerobios mesófilos totales destacándose que las muestras tratadas con aceite de orégano (0,12% V/V) presentaron los menores recuentos finales, con valores de 10^3 UFC/g, los cuales no mostraron variación durante el tiempo que duró la experiencia, presentando así un efecto bacteriostático.

Asimismo, el aceite de romero a una concentración de 0,12% V/V añadido a las muestras, también produjo el mismo efecto bacteriostático alcanzando niveles finales de 10^4 UFC/g para este grupo de microorganismos en relación a las muestras tratadas con solo eugenol (0,12% V/V) y solo ácido láctico (0,87% V/V).

Los recuentos hallados en las muestras tratadas con ácido láctico solo, aumentaron con el tiempo de almacenamiento, llegando hasta valores finales de 10^6 UFC/g, sin embargo, en ningún momento superaron los recuentos hallados en las muestras de carne sin tratar, los que fueron mayores a 10^9 UFC/g. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los recuentos en muestras sin tratar en relación a las tratadas con los compuestos antimicrobianos.

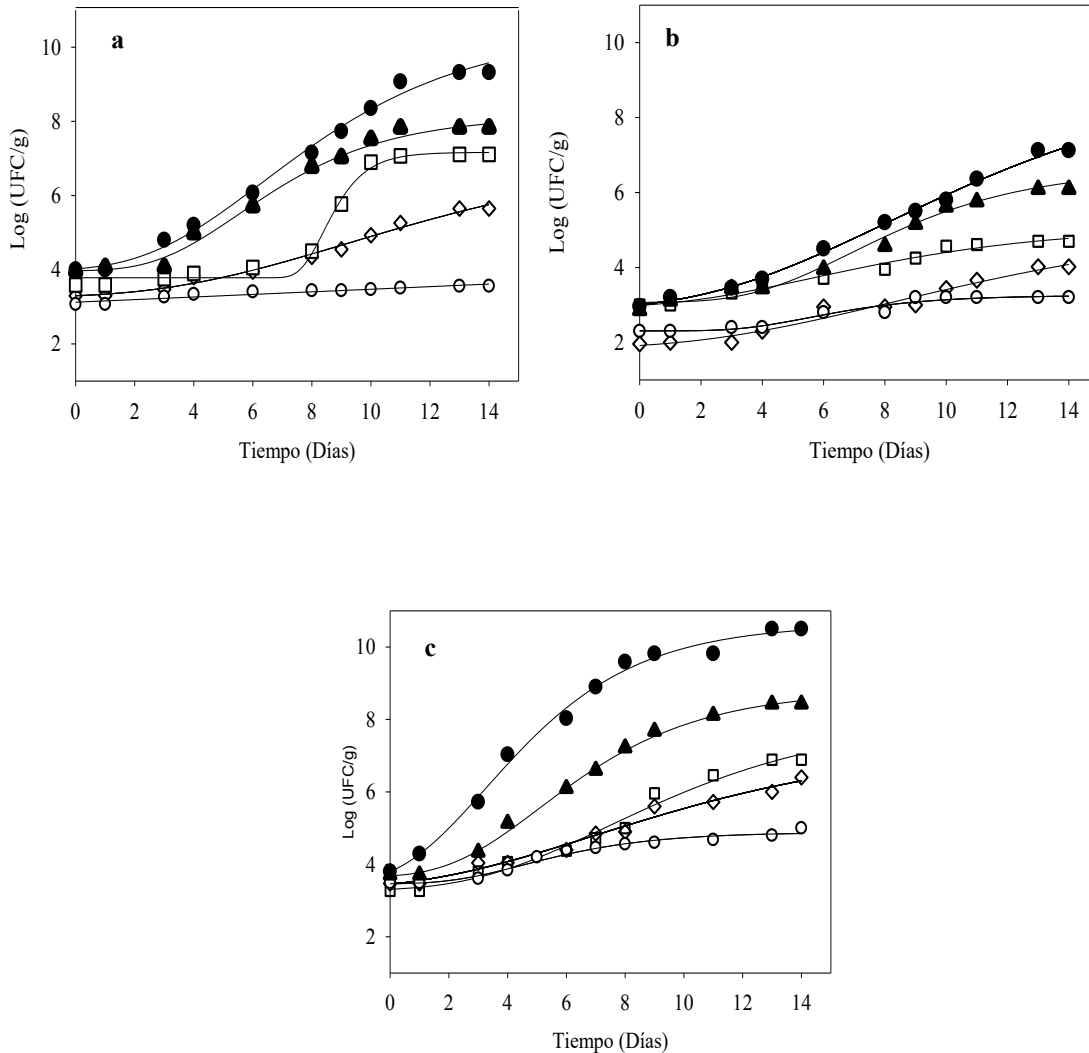


Figura 3. Desarrollo de microorganismos aerobios mesófilos totales (a); coliformes (b) y microorganismos psicrótrofos (c) en muestras de carne almacenadas a 4° C tratadas con los aceites esenciales de romero a 0,12% V/V (◇); orégano a 0,12% V/V (○); eugenol a 0,12% V/V (□) y ácido láctico a 0,87% V/V (▲) y sin tratar, consideradas como Control (●).

En las Tablas 1, 2 y 3 del Anexo 1 se presentan los ANOVA correspondientes, a partir de los cuales se observó que los tratamientos antimicrobianos en estudio presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los recuentos microbianos.

La Fig. 3. b, muestra la cinética de crecimiento de los microorganismos coliformes totales observándose al igual que en el caso anterior, que las muestras tratadas con aceites de orégano (0,12% V/V) y romero (0,12% V/V) presentaron recuentos bacterianos finales con valores de 10^3 UFC/g.

Los grupos de microorganismos presentes en el músculo (mesófilos, coliformes y psicrótrofos) fueron más sensibles al tratamiento con orégano (0,12% V/V) en comparación con los demás tratamientos. Los aceites esenciales de orégano, eugenol y romero (cada uno en concentraciones de 0,12% V/V) generaron inhibición en los recuentos de microorganismos coliformes de más de 3 Log, respecto a los recuentos en las muestras sin tratamiento. Por otro lado, en las muestras control, se presentaron recuentos finales de 10^7 UFC/g de coliformes para el día 14.

La cinética de crecimiento de microorganismos psicrótrofos en las carnes con tratamientos antimicrobianos y muestras control se presentan en la Fig. 3.c. Al igual que en los casos anteriores, se destaca el efecto del aceite de orégano (0,12% V/V), donde los recuentos finales resultaron ser menores (hasta 10^4 UFC/g) durante el almacenamiento en comparación con los encontrados en las demás carnes tratadas, siendo los recuentos iniciales menores a 10^3 UFC/g.

Al día 8, las muestras con adición de los distintos aceites esenciales, presentaron recuentos que oscilaron entre las 10^4 UFC/g. Diferente efecto se observó en las muestras tratadas con ácido láctico (0,87 %V/V), donde los recuentos superaron este valor (6 Log UFC/g) pero sin llegar a ser mayores que las muestras control (10^9 UFC/g).

Es importante destacar que en todas las muestras, los recuentos de Psicrótrofos fueron siempre mayores (entre 5 y 6 Log UFC/g) durante el periodo de almacenamiento, en comparación con los recuentos de aerobios mesófilos y coliformes.

En nuestro caso, la concentración de 0,12% V/V de aceites esenciales de romero, orégano y eugenol, ejerció un efecto antimicrobiano en el desarrollo de mesófilos, coliformes y psicrótrofos presentes en carnes refrigeradas de acuerdo a lo establecido en la Figura 3. Es importante considerar la influencia y tipos de interacción entre sustancias naturales como los aceites esenciales y la matriz alimentaria. Tserennadmid y col. (2010) al estudiar la interacción entre los ingredientes alimentarios de extracto de carne y aceites esenciales de *Citrus lemon*, *Juniperus communis*, *Origanum majorana* y *Salvia sclarea* encontraron que la matriz alimentaria puede representar una barrera física para que el aceite esencial actúe sobre la carga microbiana inicial. Los aceites esenciales disueltos en la grasa del alimento pueden estar menos disponibles para actuar sobre los microorganismos que están disueltos en la fase acuosa.

Otros investigadores (Karabagias y col., 2011) han estudiado el uso de aceites esenciales de Timol y orégano sobre muestras cárnicas de cordero en combinación con temperaturas de refrigeración. Observaron un efecto antimicrobiano inhibiendo la carga microbiana inicial (*Pseudomonas* sp. y *Brochothrix thermosphacta*) del músculo en forma coincidente con el presente estudio. Asimismo, concluyen que estos tratamientos permiten extender la vida útil del músculo, además de otorgarle características sensoriales aceptables al mejorar el sabor y el color. Dichos autores, informaron que al día 11 de almacenamiento en refrigeración, en muestras de carne con 0,10 y 0,30% de aceite de orégano, los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales alcanzaron valores de 6 Log UFC/g. En nuestro caso, al día 11 de tratamiento, en la carne refrigerada con orégano, los microorganismos aerobios mesófilos se encontraron en niveles menores a 3 Log UFC/g.

De acuerdo con la International Commission on Microbiological Specifications for Foods ICMSF (1986), el recuento de mesófilos totales en carnes que alcance valores de 7 Log UFC/g es considerado como límite de aceptabilidad. Teniendo en cuenta nuestros resultados y dicho límite de aceptabilidad definido por la ICMSF, podemos afirmar que los tratamientos con aceites esenciales podrían llegar a contribuir sobre la extensión de la vida útil de éste tipo de alimentos.

Algunos autores han utilizado el aceite esencial de orégano para controlar el desarrollo microbiano en carnes. Por ejemplo Tsigarida y col. (2000) informaron una inhibición de la microflora inicial en carne vacuna tratada con orégano 0,80% V/V en 2 a 3 Log con respecto a los recuentos de las muestras control. Asimismo, Skandamis y Nychas (2001), informaron una disminución inmediata en el recuento de mesófilos en 1 Log en carne vacuna con agregado de 1,00% V/V de aceite de orégano.

El uso de aceites esenciales como romero (0,12% V/V) y eugenol (0,12% V/V) también ejerció un efecto inhibitorio de la microflora inicial de la carne. Estos resultados coinciden con los informados por Cutter (2000), quien ensayó el aceite de romero sobre la superficie de trozos de carne de corte de peceto bovino almacenado a 4 °C durante 7 días, logrando una disminución en los recuentos de aerobios mesófilos y coliformes. El efecto antimicrobiano del eugenol también ha sido extensamente estudiado por varios investigadores, no sólo sobre microorganismos patógenos sino sobre la microflora acompañante de la carne. Hao (1997) evaluó el efecto inhibitorio del eugenol (1,00%V/V)

y la temperatura de almacenamiento (5 °C) de carne vacuna sobre microorganismos psicrótrofos como *Aeromonas hydrophilla*. Los resultados del citado estudio demostraron que después de 14 días de almacenamiento, se evidenció una reducción en 2 Log UFC/g en comparación con los recuentos informados en las muestras control. En nuestro caso, al final de la experiencia, en las carnes tratadas con 0,12% V/V de eugenol, la reducción de microorganismos psicrótrofos fue de 3 Log UFC/g en comparación con las muestras sin tratamiento.

El ácido láctico se ha catalogado como un aditivo alimentario, entendiéndose por tal a toda sustancia o mezcla de éstas que se agrega intencionalmente a los alimentos en cantidades ínfimas con el objeto de modificar sus características organolépticas, mejorar o facilitar su proceso de elaboración, conservación o su uso (Mohino, 1984).

Con el fin de estudiar el efecto del ácido láctico sobre especies microbianas y matrices alimentarias, algunos autores han investigado su acción sobre la membrana de las Enterobacterias. Alakomi y col. (2000) llegaron a la conclusión que dicho ácido orgánico en concentraciones de 5 mM actúa como un potente desintegrador de la membrana celular microbiana causando un daño en los Gram negativos, al alterar la permeabilidad celular.

Según Ray y Sandine (1992) en condiciones naturales, tales como en alimentos que presentan bajo pH debido al agregado de este ácido, numerosos metabolitos pueden estar presentes, tales como los lipofílicos, el peróxido de hidrógeno, el sistema lactatoperoxidasa, el diacetilo y penetrar la membrana de estas bacterias con una importante acción antimicrobiana.

Según Helander y col. (1997) la concentración de ácido láctico agregada en combinación con otros factores antimicrobianos, como la temperatura, pueden ser fundamentales para conseguir la inhibición de las bacterias Gram negativas o de otros patógenos asociados al músculo cárnico.

Lo anterior, puede explicar el efecto inhibitorio del ácido láctico sobre la microflora presente en la carne refrigerada. En la presente investigación, los recuentos microbianos hallados al final del periodo de almacenamiento en carnes con agregado de ácido láctico disminuyeron en 2 Log UFC/g con respecto a los recuentos en las muestras control. El ácido láctico agregado y el pH natural del músculo cárneo (5,6) permitieron generar un ambiente poco propicio para el desarrollo de la flora bacteriana.

En determinaciones anteriores llevadas a cabo por el grupo investigador se observó que el agregado de ácido láctico en concentraciones de 0,87% V/V hizo descender el pH natural de la carne de 6,1 hasta 5,6 coincidiendo con los resultados del presente trabajo. Coll Cárdenas y col. (2008) almacenaron muestras de carne inoculadas con *Pseudomonas* sp. y *E. coli* con distintas películas (polietileno y EVA SARAN EVA) a diferentes temperaturas (0, 4 y 10 °C) durante 2, 5, 8, 10, 12, 14, 20, 25, 30 y 45 días. Al día 30 de almacenamiento a 4 °C, los recuentos de *E. coli* disminuyeron en 5 Log UFC/g en las muestras tratadas con ácido láctico (pH 5,6) y envasadas con EVA SARAN EVA en comparación con las muestras con pH inicial 6,1; en tanto en el caso de los recuentos de *Pseudomonas* sp, se observó una disminución de 2 Log UFC/g. Los autores concluyeron que es posible incrementar la vida útil del músculo modificando su pH con ácido láctico, retardando el deterioro causado por microorganismos que crecen en las carnes envasadas con distintas películas y almacenadas a temperaturas de refrigeración.

Cudjoe (1988) estudió el efecto de los aerosoles de ácido láctico como posible método en la conservación de carne durante el almacenamiento. La aplicación de 0,87% V/V de ácido láctico en la superficie de la carne resultó en una reducción significativa en el total de los recuentos de microorganismos viables durante el almacenamiento a 4 °C. La vida útil de las muestras con ácido láctico se extendió por tres días.

A pesar de la eficiencia en el uso de aditivos como este ácido para preservar alimentos, existe una tendencia general en estudiar alternativas naturales como métodos de preservación.

4.4.2 Modelo Matemático

La microbiología predictiva tiene como finalidad asociar condiciones ambientales y las respuestas microbianas a las mismas. También permite evaluar objetivamente el efecto de los procesos en la seguridad alimentaria y en la calidad de los alimentos. Esto incluye conocimientos sobre el comportamiento microbiano en los alimentos y la derivación de los modelos matemáticos (McMeekin y Ross, 2002). Los recuentos microbianos obtenidos luego de aplicar diferentes aceites esenciales así como ácido láctico, fueron modelados matemáticamente con la ecuación modificada de Gompertz (ecuación 1), y en los casos en

los que no se evidenció crecimiento microbiano visible se utilizó el modelo lineal (ecuación 2), a partir de las ecuaciones descritas en Materiales y Métodos. Estos, se detallan en la Tabla 7, donde también se presentan los parámetros derivados de dicha ecuación.

En la Fig. 3. a, b y c se presentan las gráficas que muestran un buen ajuste de los datos experimentales al modelo propuesto. La Tabla 7 presenta los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano de aerobios mesófilos, coliformes y psicrótrofos en muestras cárnicas con el agregado de aceites esenciales de orégano, romero, eugenol y ácido láctico y muestras sin tratar (control) refrigeradas a 4 °C luego de la aplicación de las ecuaciones mencionadas.

Se observó que para el caso de la velocidad específica de crecimiento, en las carnes tratadas con orégano (0,12%V/V) almacenadas a 4 °C, presentaron resultados de 0,03 Log (UFC/g) días⁻¹ para los microorganismos aerobios mesófilos. En este caso, no fue posible utilizar el modelo Gompertz ya que los microorganismos no crecieron de manera representativa para la utilización de dicho modelo, en su lugar, se utilizó el modelo lineal. Es por ello que los valores relacionados con el modelo Gompertz no se muestran en la Tabla 7.

En las carnes tratadas con romero (0,12% V/V), éste parámetro (μ) para los aerobios mesófilos disminuyó en 0,3 unidades Log (UFC/g) días⁻¹ respecto del control, resultando ser los de menor valor con respecto a los encontrados en las carnes sometidas a los demás tratamientos. En tanto, en las carnes tratadas con aceite de orégano (0,12% V/V) y láctico (0,87%V/V), μ para coliformes, varió en un rango entre 0,15 y 0,40 Log (UFC/g) días⁻¹, respectivamente. En el caso de los microorganismos psicrótrofos, se obtuvieron valores que oscilaron entre 0,20 y 0,60 Log (UFC/g) días⁻¹ con orégano (0,12% V/V) y ácido láctico (0,87% V/V) respectivamente.

En cuanto a la fase de latencia, LPD, observamos que para el caso de microorganismos aerobios mesófilos en carnes con orégano (0,12%V/V) exhibieron un valor de 14,32 días. Las carnes con los demás tratamientos (romero a 0,12% V/V, eugenol a 0,12% V/V y A. láctico a 0,87 %V/V) presentaron valores de LPD que oscilaron entre 2,94 y 7,79 días. Este valor disminuyó en 0,61 unidades con respecto a las carnes sin tratamiento antimicrobiano, donde los aerobios mesófilos se mantuvieron en esta fase durante menor tiempo (2,33 días). En tanto, para el caso de los coliformes en las carnes tratadas con orégano (0,12%V/V) y ácido láctico (0,87 %V/V), éstos se mantuvieron por más tiempo en fase de latencia,

presentándose valores de LPD de 3,21 y 3,55 días, respectivamente. Mientras que para los microorganismos psicrótrofos hallados en la carne tratada con ácido láctico (0,87% V/V) y eugenol (0,12% V/V), presentaron los mayores valores de LPD 2,58 y 2,77 días respectivamente.

Al considerar la máxima densidad poblacional, MPD, se observa que, para el caso de recuentos de aerobios mesófilos, en las carnes tratadas por separado con 0,12% V/V de romero, orégano, eugenol, y 0,87% V/V de láctico, los valores hallados resultaron entre 7,19 y 7,90 Log (UFC/g). En las muestras control, el valor de MPD fue de 10,46 Log (UFC/g), resaltándose una diferencia de 2,47 unidades. En tanto, en carnes tratadas con orégano (0,12% V/V) y láctico (0,12% V/V), los recuentos de coliformes referidos a este parámetro, oscilaron entre 3,25 y 6,67 Log (UFC/g) respectivamente, presentando en el primero de los casos una diferencia de 2,57 unidades menos con respecto al control (10,46 Log (UFC/g)). En relación a este mismo parámetro, los recuentos de psicrótrofos presentaron valores que oscilaron entre 4,0 y 8,0 Log (UFC/g) para las carnes tratadas con aceites esenciales. Mientras que en muestras con ácido láctico (0,12% V/V), se obtuvieron mayores valores para este parámetro (8,8 Log (UFC/g)), teniendo una diferencia de 1,80 Log (UFC/g) con respecto a las carnes sin tratamiento.

Comparando el valor de MPD para los coliformes y psicrótrofos referidos al tratamiento con orégano (0,12% V/V) se observaron valores entre 3,25 y 4,88 Log (UFC/g) respectivamente, siendo estos los valores más bajos en relación a los demás tratamientos (romero 0,12% V/V, eugenol 0,12% V/V y ácido láctico 0,87% V/V). Asimismo hay una diferencia de 6,0 y 5,62 Log (UFC/g), respectivamente con respecto al control.

Tabla 7. Parámetros de la ecuación de Gompertz sobre el desarrollo de microorganismos aerobios mesófilos, coliformes y psicrótrofos en muestras cárnicas con el agregado de aceites esenciales de orégano, romero, eugenol y ácido láctico y muestras sin tratar (control) refrigeradas a 4 °C.

	a	c	b	m	μ	LPD	MPD	R ²
<u>MESÓFILOS TOTALES</u>								
Romero (0,12% V/V)	3,25±0,14	3,94±1,18	0,16±0,05	9,18±1,59	0,23±0,11	3,06±1,57	7,27±1,23	0,988
Orégano (0,12% V/V)	-----	-----	-----	-----	0,03	14,32	-----	0,985
Eugenol (0,12% V/V)	3,78±0,07	3,38±0,13	1,25±0,21	8,39±0,10	1,55± 0,99	7,59±0,10	7,19±0,20	0,996
A. Láctico (0,87 % V/V)	3,99±0,16	4,00±0,27	0,44±0,07	5,22±0,32	0,64± 0,15	2,94±1,47	7,99±0,43	0,985
Control	3,97±0,34	6,49±1,02	0,25±0,06	6,33±0,65	0,59±0,35	2,33±1,18	10,46±1,36	0,994
<u>COLIFORMES TOTALES</u>								
Romero (0,12% V/V)	1,83±0,32	3,36±1,74	0,15±0,09	8,23±2,43	0,19±0,14	1,89±1,90	5,19±2,06	0,990
Orégano (0,12% V/V)	2,31±0,06	0,94±0,11	0,44±0,14	5,49±0,60	0,15±0,02	3,21± 2,08	3,25±0,17	0,958
Eugenol (0,12% V/V)	2,91±0,19	2,18±0,48	0,21±0,07	5,66±0,84	0,16±0,04	1,10± 2,47	5,09±0,67	0,993
A. Láctico (0,87% V/V)	3,06±0,15	0,94±0,11	0,30±0,08	6,89±0,56	0,40±0,01	3,55±1,79	6,67±0,26	0,979
Control	2,87±0,19	6,34±1,02	0,16±0,03	8,11±0,74	0,37±0,01	1,86±0,61	9,24±1,21	0,986
<u>PSICRÓTROFOS TOTALES</u>								
Romero (0,12% V/V)	3,29±0,39	4,06±1,43	0,17±0,08	6,93±1,23	0,25±0,18	1,04±0,77	7,36±1,82	0,980
Orégano (0,12% V/V)	3,46±0,07	1,42±0,12	0,39±0,08	4,54±0,39	0,20±0,02	1,97±0,91	4,88±0,19	0,980
Eugenol (0,12% V/V)	3,27±0,23	4,78±1,05	0,21±0,10	7,39±0,90	0,36±0,31	2,77±1,77	8,05±1,28	0,981
A. Láctico (0,87% V/V)	3,72±0,09	4,98±0,20	0,35±0,03	5,44±0,16	0,64±0,10	2,58±1,46	8,70±0,29	0,996
Control	3,88±0,46	6,62±0,73	0,40±0,10	3,85±0,49	0,97±0,61	1,35±1,05	10,50±1,19	0,980

a: Log (UFC/g), c: Log (UFC/g), b: días -¹, m: días, μ : Log (UFC/g) días - 1, MPD: Log (UFC/g), LPD: (días).

Estudios previos, han informado la eficacia de aceites esenciales en el control de crecimiento de microorganismos patógenos hallando diferencias en los parámetros μ y LPD, con respecto a muestras sin tratar. Por ejemplo, Tserennadmid y col. (2010) utilizaron aceite esencial de orégano en concentraciones de 0,0625 - 1,000 $\mu\text{L ml}^{-1}$ sobre extracto de carne inoculado con *E. coli*; mediante el modelo Gompertz determinaron que μ del microorganismo evaluado en el extracto de carne con orégano al 0,25%V/V fue de 0,363 Log (UFC/g) días⁻¹, teniendo valores 1,06 veces inferiores en comparación con el extracto sin tratar (0,385 Log (UFC/g) días⁻¹). La duración de LPD de *E. coli* en la muestra control resultó de 5 horas, mientras que en las tratadas varió entre 6 y 27 horas, aumentando a medida que se incrementaba la concentración del aceite.

Estos investigadores no utilizaron recuentos en placa, en su lugar realizaron ensayos midiendo la absorbancia para construir las curvas de crecimiento de *E. coli*. Sin embargo al igual que en nuestro estudio, el uso de aceites esenciales produjo efecto antimicrobiano, y los parámetros de crecimiento establecidos en los modelos matemáticos ayudaron a explicar de mejor manera su efecto.

Algunos estudios, han utilizado el modelo de Gompertz para evaluar el efecto del ácido láctico y la temperatura en carne refrigerada encontrando parámetros de crecimiento correspondientes al desarrollo de microorganismos de interés alimentario.

Coll Cárdenas y col. (2008) llegaron a tener consideraciones semejantes a las nuestras. Analizaron matemáticamente y modelaron el efecto de las temperaturas de almacenamiento (0, 4 y 10 °C) sobre el crecimiento de tres microorganismos aislados de muestras de carne: *Klebsiella* sp, *E. coli* y *Pseudomonas* sp inoculadas separadamente en medios de cultivo con diferentes concentraciones de ácido láctico hasta alcanzar valores de pH entre 5,6 y 6,1. Encontraron correlaciones satisfactorias entre μ y LPD con la concentración de ácido láctico (0,87% V/V) para los microorganismos estudiados a las temperaturas de almacenamiento correspondientes.

De acuerdo con los resultados de nuestra investigación, el modelado matemático ayuda a mostrar más claramente el comportamiento de los microorganismos sometidos a los tratamientos en estudio. Es por ello que se puede afirmar que la adición de aceites esenciales contribuye a una mayor inhibición de los grupos microbianos presentes en el músculo, en comparación con el agregado de ácido láctico. Este fenómeno puede deberse a

que algunas concentraciones bacteriostáticas de ácido láctico conducen a agentes tolerantes a la acidez, esto se debe posiblemente a la evolución de la resistencia a los ácidos en los microorganismos previamente susceptibles (Davidson y Harrison, 2002).

4.4.3 Efecto antimicrobiano de mezclas binarias de aceites esenciales y ácido láctico sobre el músculo cárneo

Por medio de la determinación de la CMI de las mezclas binarias entre aceites y con ácido láctico (Tabla 4 y 5) se hallaron la Concentración Fraccionaria Inhibitoria y el índice CFI sobre cepas de *S. aureus*, *Salmonella* spp. y *E. coli* (Tabla 6).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se procedió a seleccionar dos mezclas binarias, una entre aceites esenciales y la otra con ácido láctico. Las mismas fueron elegidas debido a la actividad antimicrobiana específica, que se destacó entre las otras mezclas. La mezcla binaria de aceites seleccionada (Tabla 4) fue romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y la mezcla con láctico (Tabla 5) fue de ácido láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V). La primera, presentó sinergismo contra la cepa de *Salmonella* spp y la segunda mezcla fue efectiva sobre *Salmonella* spp. y *S. aureus* (Tabla 6).

El efecto sinérgico de la mezcla de aceites esenciales sobre distintas matrices alimentarias ha sido corroborado por algunos investigadores. Por ejemplo, estudios realizados por De Azeredo y col. (2011) demostraron un efecto sinérgico a partir de la mezcla de aceites de orégano y romero sobre *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* y *Aeromonas hydrophilla* sobre vegetales mínimamente procesados.

En nuestra investigación no estudiamos en forma molecular el efecto de los aceites esenciales, es por esto que es difícil establecer el mecanismo exacto del efecto sinérgico causado por la combinación de los aceites esenciales de romero y orégano. Sin embargo, algunos estudios sugieren que el aumento de la actividad antimicrobiana causada por la mezcla de estos aceites esenciales podría deberse en parte a la variada composición de cada aceite esencial (Elgayyar y col., 2000).

Por otro lado, es escasa la información bibliográfica sobre combinaciones entre una concentración bacteriostática de ácido láctico y compuestos aromáticos de aceites esenciales de manera simultánea en un mismo medio de crecimiento. Sin embargo, un

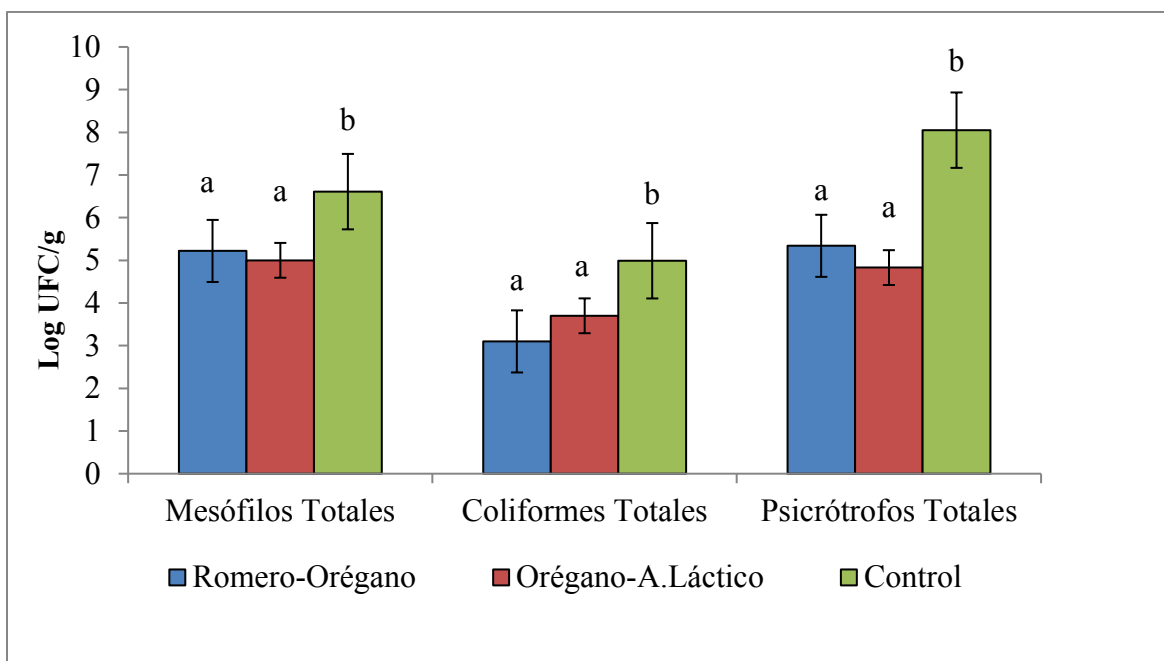
estudio realizado por Dimitrijevic y col., (2007) corroboró que la mezcla entre aceite de orégano y ácido láctico ha resultado ser efectiva contra el desarrollo de *L. monocytogenes* demostrando efecto sinérgico. Asimismo, un estudio en medios de crecimiento realizado por Friedly y col. (2009) demostró el efecto sinérgico entre mezclas de ácidos orgánicos como el láctico, tartárico y aceites esenciales en la inhibición de crecimiento de *Listeria* spp.

A los ácidos orgánicos como el ácido láctico se le atribuyen efectos antimicrobianos como la modificación del pH, estrés osmótico y perturbación de la membrana en células bacterianas (Hirshfield, y col., 2003). Es por ello, que su efecto resulta ser efectivo al mezclarse con aceites esenciales sobre la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos que deterioran alimentos. En nuestro caso, el efecto antimicrobiano de las mezclas de aceites y ácido láctico fue demostrado.

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las mezclas mencionadas sobre el final del desarrollo de microorganismos alteradores almacenados a 4 °C comúnmente encontrados en carnes bovinas en refrigeración.

La Figura 4 muestra los resultados de la capacidad antimicrobiana en cuanto a los recuentos finales de mesófilos, coliformes y psicrótrofos en muestras de carne tratadas con las mezclas de antimicrobianos almacenadas a 4 °C. Se observó que, al final del periodo de almacenamiento, los recuentos microbianos hallados en las muestras con adición de mezclas, alcanzaron aproximadamente promedios de 10^5 Log UFC/g. En todos los casos, este valor fue superado por los encontrados en las muestras control (10^8 Log UFC/g).

Se realizó el ANOVA correspondiente con el fin de analizar los datos estadísticamente. No hubo diferencias significativas en los recuentos microbianos hallados en las muestras tratadas con las dos mezclas, pero sí hubo diferencias significativas, en relación con los recuentos de las muestras control ($p < 0,05$). Estos resultados se presentan en las Tablas 4, 5 y 6 del Anexo 2.



Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Figura 4. Efecto las mezclas binarias de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y A. láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) sobre los recuentos finales de microorganismos mesófilos, coliformes y psicrótrofos (Log UFC) en el músculo cárneo almacenado a 4 °C.

En la Figura 5.a, b y c se muestra el desarrollo microbiano en las muestras de carne tratadas con mezclas binarias de antimicrobianos durante el almacenamiento refrigerado a 4 °C.

En la Figura 5.a se observa cómo progresa el crecimiento de aerobios mesófilos en muestras de carne tratadas con las mezclas binarias de antimicrobianos y muestras control. Aproximadamente, al día 8 de almacenamiento a 4 °C, los recuentos en las muestras con tratamientos alcanzaron niveles de 10^5 UFC/g. Al final de la experiencia, los recuentos hallados en las muestras con romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V), lograron alcanzar niveles de 10^6 UFC/g, encontrándose diferencias entre los dos tratamientos de 0,34 unidades. En tanto, las muestras tipo control, alcanzaron recuentos de 10^8 Log UFC/g.

De acuerdo con la Figura 5.b, el desarrollo de coliformes en las muestras ocurre de forma progresiva. Al día 5 de almacenamiento, en las muestras con agregado de mezclas antimicrobianas, los recuentos alcanzaron niveles de 10^3 UFC/g. Subsiguiente a este periodo, en las muestras con láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V), los recuentos aumentaron con respecto a los hallados en muestras tratadas con romero - orégano

(0,06%/0,06% V/V) y al tiempo final de almacenamiento, se presentaron diferencias de aproximadamente 1,46 unidades. En tanto, los niveles de recuentos microbianos finales en muestras control superaron las 10^7 UFC/g, con diferencias en más de 2 unidades, con respecto a los hallados en las muestras tratadas.

El desarrollo de microorganismos psicrótrofos en las carnes con las mezclas mencionadas, se presentan en la Fig. 5.c.

A pesar de que las bacterias se desarrollan progresivamente, al tiempo final del almacenamiento, en las muestras tratadas con la mezcla de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V), se registraron recuentos microbianos que alcanzaron las 10^7 UFC/g. En tanto, en las carnes con adición de orégano - ácido láctico, los recuentos finales alcanzaron las 10^6 UFC/g. Así, las diferencias entre los recuentos fueron de 1,13 unidades. Al término de la experiencia, en las muestras control se hallaron recuentos de 10^9 Log UFC/g, presentando así, diferencias de 3 unidades, con respecto a los recuentos en las muestras con tratamientos. Adicionalmente, es importante destacar el efecto de las mezclas sobre el recuento microbiano al tiempo inicial. Se observó que al inicio del almacenamiento las muestras control presentaron recuentos microbianos tanto de mesófilos, coliformes y psicrótrofos de 10^4 UFC/g, en tanto en las muestras tratadas con las mezclas de antimicrobianos, se observó una reducción de entre 1 a 1,5 unidades en comparación con los recuentos hallados en las muestras control. Los resultados indican que las mezclas de antimicrobianos generan un efecto antimicrobiano inicial.

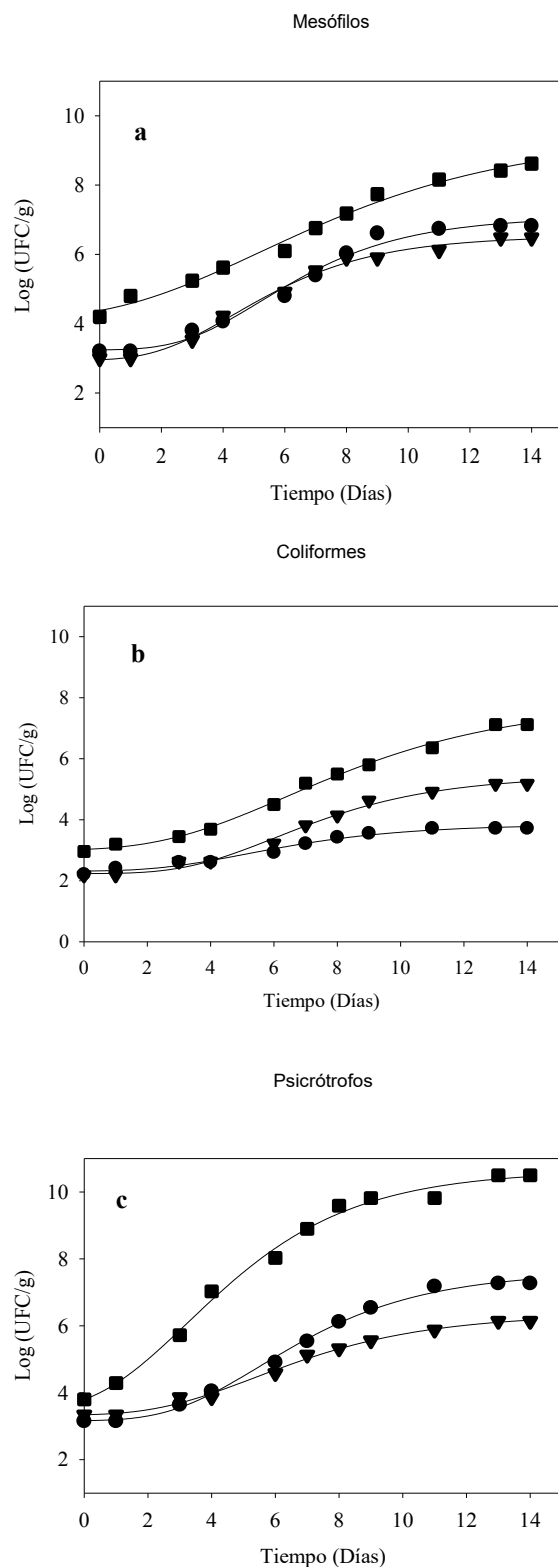


Figura 5. Efecto de la adición de antimicrobianos (●) romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y (▼) láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V); (■) sin tratar, sobre el desarrollo de aerobios mesófilos, coliformes y microorganismos psicrótrofos en músculo cárneo almacenado a 4 °C. Se observa un buen ajuste entre los datos experimentales y el modelo Gompertz.

De acuerdo a los resultados, la mezcla de orégano - ácido láctico (0,02%/0,03 % V/V); resultó ser más efectiva en el control de crecimiento de la microflora inicial del músculo cárnico estudiado, en comparación con la mezcla romero - orégano (0,06%/0,06% V/V). Este efecto se observó en la disminución del número de bacterias en las muestras cárnicas en función del tiempo de almacenamiento.

La utilización de mezclas entre compuestos antimicrobianos en matrices alimentarias como el músculo cárneo ha sido estudiada por diversos investigadores. Por ejemplo, Lin y col. (2004) utilizaron mezclas de aceites de orégano y arándanos (0,1 mg fenólico/mL, pH 7,0), aplicados a trozos de carne vacuna inoculadas con *L. monocytogenes*. La mezcla demostró un efecto importante en el control del patógeno luego de 18 h a 37 °C, así al ajustar el pH con ácido láctico, los recuentos de patógenos se redujeron en casi 3 ciclos. No se observó actividad bactericida cuando se utilizó ácido láctico solo. Estos resultados coinciden con los nuestros, donde se redujo en aproximadamente 3 Log los microorganismos alteradores del músculo, que crecieron a temperatura de refrigeración luego del día 14 de almacenamiento. Estudios de mezclas de aceites en otras carnes demostraron también el efecto antimicrobiano sobre microorganismos alteradores. Por ejemplo, Fratianni y col. (2010) utilizaron aceite balsámico y timol en carne de pollo fresca almacenada durante 3 semanas a 4 °C. Al final de la experiencia, la microflora natural del músculo disminuyó aproximadamente 50% con respecto a las muestras control. A la mezcla de aceites esenciales se les atribuyó una cierta protección a la peroxidación de los lípidos y al deterioro de las proteínas sarcoplásmicas, permitiendo definir la vida útil del producto en dos semanas de almacenamiento en refrigeración. A pesar que el músculo en el presente trabajo difiere del citado, las mezclas de antimicrobianos a concentraciones de estudio pueden proporcionar una estabilidad microbiana, además de conservar durante más tiempo las propiedades del músculo al estar refrigeradas.

Las estrategias para contrarrestar la tolerancia a las bajas temperaturas por parte de algunos microorganismos ha sido extensamente investigadas, fundando un gran interés en la necesidad de combinar el ácido láctico con otros compuestos antimicrobianos, siendo esta una táctica prometedora (MacCue y col., 2005).

A pesar del extensivo uso del ácido láctico en carnes para proporcionar beneficios en el control de bacterias que puedan alterar sus características organolépticas, se ha visto que ha

ayudado a mejorar el potencial antimicrobiano del orégano probado en medios de cultivo con *L. monocytogenes* (Lin y col., 2004). Igualmente, el efecto sinérgico dado por esta mezcla ha demostrado que afecta el metabolismo de *Helicobacter pylori* y *L. monocytogenes* (Lin y col., 2005- b).

Apostolidis y col. (2008), utilizaron sal sódica de ácido láctico (lactato de sodio al 2%) junto con aceites de orégano y arándanos (750 ppm) sobre *Listeria monocytogenes* en carne vacuna refrigerada con el fin de evaluar su efecto sinérgico. A diferencia de nuestra investigación, no utilizamos microorganismos patógenos para inocular en el músculo, se evaluaron microorganismos alteradores, pero al igual que en la investigación citada, sí agregamos de forma proporcional (50:50) cada uno de los compuestos en concentraciones distintas. Los investigadores observaron que efectivamente, el uso de la mezcla entre orégano y la sal sódica de ácido láctico tenía potencial antimicrobiano mucho más notorio que con el láctico solo sobre el desarrollo de *L. monocytogenes*. Encontraron diferencias en 2 Log UFC/mL con respecto a las muestras control luego de los 20 días que duró dicho estudio. Sus hallazgos permitieron concluir que los compuestos fenólicos junto con el láctico al encontrarse en la membrana pueden ingresar al citosol y actuar sobre enzimas claves en sistemas energéticos como la oxidación de prolina. En nuestros resultados, los recuentos de aerobios, coliformes y microorganismos psicrótrofos en carnes almacenadas a 4 °C con agregado de mezclas romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 %V/V) arrojó como resultado una diferencia entre 2 a 5 unidades, con respecto a los recuentos en muestras sin tratamiento. Por lo tanto, se manifestó un mayor rango de inhibición en comparación con lo informado por Apostolidis y col. (2008).

Considerando los antecedentes expuestos en los trabajos mencionados, solo se determinó el cambio de pH en muestras con agregado de mezclas binarias. El pH inicial de la carne con el agregado de láctico - orégano (0,02%/0,03 %V/V) fue de 5,8 y el final de 4,9. Asimismo, en las muestras con romero - orégano (0,06% /0,06% V/V), el pH final fue de 5,3. Se puede observar que la mezcla de láctico - orégano disminuyó en 0,9 unidades el pH de la carne propiciando un ambiente eficaz para la disminución de microorganismos presentes en el músculo cárneo. Se cree que los compuestos fenólicos de aceites esenciales y ácidos orgánicos como el ácido láctico, poseen potencial antimicrobiano debido a que causan una hiperacidificación por ser dadores de protones en la interfase de la membrana plasmática y

acidificar a nivel intracelular el citosol de los microorganismos, por lo cual su exceso puede alterar los protones H^+ de ATPasa requeridos para la síntesis de ATP. Además tienen la habilidad de reprimir el flujo libre de electrones desde la cadena de transporte a lo largo de la membrana bacteriana, o también inhibir deshidrogenasas unidas al flujo protónico (Lin y col., 2005-a).

Algunas otras mezclas de compuestos fenólicos de aceites esenciales han sido probadas en diversas matrices alimentarias. Por ejemplo Mastromatteo y col. (2009) combinaron dos componentes principales del orégano como timol y carvacrol junto con la temperatura de refrigeración (4 °C) sobre la calidad de hamburguesas de carne de ave. Se controló el crecimiento microbiano (recuento total de células viables, Enterobacteriaceae, bacterias ácido lácticas y *Pseudomonas* spp.). Concluyeron que la calidad microbiológica de las carnes fue influenciada por la adición de mezclas de antimicrobianos en combinación con temperatura de refrigeración. Así, al final del periodo de almacenamiento, en las carnes tratadas hubo una reducción de aproximadamente 1,5 Log UFC/g en los recuentos microbianos.

En nuestro caso, se observaron bajos recuentos de los grupos de microorganismos estudiados al final de la experiencia y durante toda la etapa de refrigeración en las carnes tratadas con las mezclas binarias de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V).

El aceite de romero también ha sido probado en muestras cárnicas junto con otros compuestos para evaluar su efecto sinérgico sobre algunos microorganismos. Por ejemplo, Fernández - López y col. (2004) utilizaron aceites de romero, naranja y limón en albóndigas de carne y evaluaron su efecto sobre microorganismos relacionados con su deterioro. A diferencia de nuestro estudio, los investigadores utilizaron el método de dilución en placa para evaluar la actividad antimicrobiana de las mezclas. Sometieron a cocción las carnes con los compuestos, luego realizaron evaluación sensorial y valoración de color y olor. A pesar del uso de metodologías distintas, sus hallazgos coincidieron con los nuestros, confirmando que el aceite de romero en mezcla funcionó mejor como antimicrobiano que de forma individual atribuyendo este fenómeno a su composición, la cual posee gran cantidad de compuestos fenólicos no polares.

Se modeló matemáticamente el desarrollo de mesófilos, coliformes y psicrótrofos presentes en las carnes con las mezclas binarias de antimicrobianos en estudio.

En ningún caso fue necesario utilizar el modelo de regresión lineal, ya que para todas las condiciones, el crecimiento fue evidente. En su defecto, se utilizó el modelo de Gompertz, tal cual se ha descrito en materiales y métodos.

Los parámetros obtenidos de dicho modelado se detallan en la Tabla 8.

Al analizar los diferentes parámetros de Gompertz, podemos decir que para la velocidad específica de crecimiento μ a una temperatura de 4 °C de almacenamiento, en mesófilos, prácticamente no se observaron diferencias entre los resultados presentados en carnes con y sin los diferentes tratamientos antimicrobianos. Su rango fue de 0,50 a 0,59 Log UFC/g días⁻¹. En tanto, tampoco se observaron diferencias para coliformes, con rango de 0,23 a 0,37 Log UFC/g días⁻¹ y para Psicrótrofos, el rango fue de 0,36 - 0,97 Log UFC/g días⁻¹.

En cuanto al parámetro LPD, se observó que los aerobios mesófilos en las muestras con y sin tratamiento se mantuvieron en fase de latencia entre 1,69 a 2,59 días, presentando el periodo más corto las muestras con la mezcla láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V). En tanto, los coliformes que se situaron por más tiempo en esta fase fueron los hallados en muestras con romero - orégano (0,06%/0,06% V/V), donde el valor fue de 3,43 días. En cuanto a los Psicrótrofos, se observó que duraron por menos tiempo en esta fase, en comparación con los recuentos en las muestras sin adición de mezclas. Por el contrario, en las muestras con romero - orégano (0,06%/0,06% V/V y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V), los psicrótrofos presentaron tiempos de 2,58 y 2,76 días en fase de latencia, respectivamente.

En cuanto a MDP, se observó que mesófilos y psicrótrofos presentaron valores que oscilaron entre 6 y 7 Log UFC/g para las muestras tratadas con mezclas binarias. En cuanto a coliformes, los valores de MDP en dichas muestras fueron de 3 y 4 Log UFC/g. Por consiguiente, se evidenció una gran diferencia en referencia a lo ocurrido con las muestras control, donde las poblaciones alcanzaron valores de 9 a 10 Log UFC/g.

Tabla 8. Parámetros de la ecuación de Gompertz al desarrollo microbiano de mesófilos, coliformes y psicrótrofos en carnes almacenadas a 4 °C y con mezclas binarias de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V) antimicrobianos.

	a	c	b	m	μ	LPD	MDP	R ²
<u>MESOFILOS TOTALES</u>								
Romero - Orégano	3,24±0,15	3,83±0,27	0,38±0,06	5,23±0,33	0,53±0,12	2,59±0,74	7,07±0,42	0,993
Orégano - A. Láctico	2,94±0,11	3,58±0,18	0,38±0,04	4,33±0,23	0,50±0,07	1,69±1,46	6,52±0,29	0,999
Control	3,97±0,34	6,49±1,02	0,25±0,06	6,33±0,65	0,59±0,35	2,33±1,41	10,46±1,36	0,991
<u>COLIFORMES TOTALES</u>								
	a	c	b	M	μ	LPD	MDP	R ²
Romero - Orégano	2,41±0,06	1,37±0,12	0,46±0,12	5,61±0,42	0,23±0,12	3,43±1,76	3,78±0,18	0,994
Orégano - A. Láctico	2,19±0,11	3,67±0,39	0,24±0,04	6,86±0,44	0,32±0,39	2,69±0,44	5,58±0,50	0,998
Control	2,87±0,19	6,34±1,02	0,16±0,03	8,11±0,74	0,37±0,16	1,86±1,61	9,24±1,21	0,996
<u>PSICROTROFOS TOTALES</u>								
	a	c	b	M	μ	LPD	MDP	R ²
Romero - Orégano	3,16±0,09	4,45±0,18	0,34±0,03	5,53±0,18	0,55±0,08	2,58±1,55	7,61±0,27	0,997
Orégano - Láctico	3,37±0,14	2,93±0,32	0,34±0,09	5,71±0,44	0,36±0,10	2,76±1,61	6,30±0,46	0,994
Control	3,88±0,46	6,62±0,73	0,40±0,10	3,85±0,49	0,97±0,60	1,35±0,98	9,45±1,19	0,998

a: Log UFC/g, c: Log UFC/g, b: días⁻¹, m: días, μ : Log UFC/g días⁻¹, MPD: Log UFC/g, LPD: días.

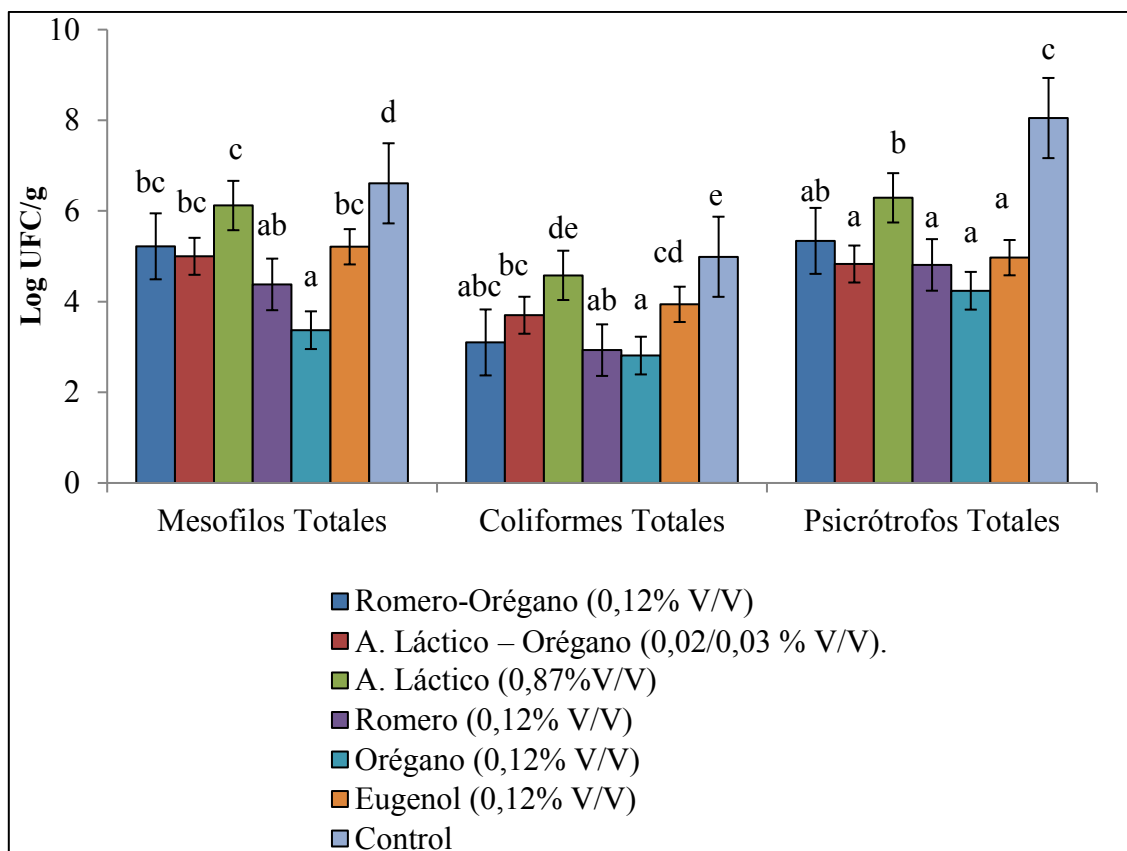
Previamente se mencionaron las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales sobre microorganismos en el modelo cárneo. Sin embargo la microbiología predictiva ayuda a comprender un poco más sobre lo que sucede con los microorganismos dentro del sistema alimentario junto con el agregado de aceites, el pH natural de la carne (5,6) y la temperatura de refrigeración.

4.4.4 Comparación del efecto antimicrobiano de aceites esenciales y ácido láctico en forma individual y en mezclas binarias sobre el músculo cárneo

El efecto que presentan los aceites esenciales y las mezclas mencionadas sobre los recuentos finales de los diferentes géneros de microorganismos presentes en el músculo se presentan en la Figura 6.

De acuerdo a los resultados, se observó en primer lugar que el aceite de orégano a una concentración de 0,12% V/V (agregado en forma individual), produjo los menores recuentos finales para mesófilos, coliformes y psicrótrofos (3,37, 2,81 y 4,24 Log UFC/g respectivamente), no observándose diferencias significativas en estos recuentos ($p > 0,05$). Siguen por su efecto inhibitorio, el aceite de romero (0,12% V/V) y la mezcla binaria de láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V).

Es importante destacar que el orégano ha sido intensamente estudiado, el timol, como su principal compuesto tiene la capacidad de desintegrar la membrana celular externa de las bacterias incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Burt, 2004). Al mezclarse con ácidos orgánicos facilita la difusión de los mismos en células de *Listeria monocytogenes* inoculadas en carne de hamburguesa refrigerada durante 5 días, permitiendo la disminución de este patógeno (Rivera y col., 2014).



Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 6. Efecto de los diferentes tratamientos antimicrobianos sobre el recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales; coliformes y psicrótrofos (Log UFC/g) en el músculo cárneo almacenado a 4 °C al final del periodo de almacenamiento.

De acuerdo a estos resultados, se observaron diferencias significativas en el desarrollo de aerobios mesófilos y coliformes de las muestras con todos los tratamientos de estudio. Por el contrario, en las muestras con romero (0,12% V/V), orégano (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V) y la mezcla de láctico - orégano (0,02%/0,03 %V/V), no se encontraron diferencias significativas en el desarrollo de Psicrótrofos ($p > 0,05$), pero sí hubo diferencias en relación a los demás tratamientos.

Los recuentos finales de los microorganismos presentes en el músculo refrigerado sin adición de tratamientos fueron más elevados con respecto a las carnes tratadas, presentándose diferencias significativas ($p < 0,05$). Los resultados se analizaron mediante el ANOVA correspondiente que se presenta en la Tabla 1, 2 y 3 del Anexo 1.

En las Tablas 7 y 8 se describen los parámetros de Gompertz aplicados al crecimiento microbiano referente a las muestras en estudio.

De manera general, se observó que con respecto al parámetro μ , los menores valores fueron los hallados en muestras con el agregado individual de orégano (0,12% V/V), romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V), oscilando entre 0,03 y 0,53 Log (UFC/g) días⁻¹ respectivamente. Con respecto a LPD, los microorganismos en las muestras con estos mismos tratamientos se mantuvieron durante mayor tiempo. Cabe destacar que en las muestras con orégano, los microorganismos Mesófilos presentes en el músculo se conservaron en esta fase durante 14 días. En tanto en las muestras control se presentaron valores menores a 2 días.

En relación a la MDP, se observó que, todos los grupos de microorganismos (mesófilos, coliformes, psicrótrofos) presentes en las muestras con los tratamientos de estudio, presentaron valores menores en comparación a los hallados en el control, donde este valor superó 9,24 Log UFC/g. Con respecto a la adición individual de aceites esenciales, los recuentos microbianos con menor MDP, se observaron en las muestras con agregado de orégano, donde coliformes y psicrótrofos presentaron valores de 3,25 y 4,08 Log UFC/g respectivamente. En relación con las mezclas de antimicrobianos, la adición de láctico - orégano (0,02%/0,03 %V/V), presentó los recuentos más bajos de aerobios mesófilos, coliformes y psicrótrofos, con valores de 6,52, 5,58 y 6,30 Log UFC/g, respectivamente.

Analizando los resultados observados podemos decir que el agregado individual de aceite de orégano (0,12% V/V), y las mezclas de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V), funcionaron mejor en el control de crecimiento de todos los microorganismos estudiados del músculo. Su acción inhibitoria se relaciona con la disminución de las velocidades de crecimiento, y la duración por más tiempo en fase de latencia, en comparación con los microorganismos presentes en las muestras sin agregado de tratamientos. En cuanto al agregado de aceites de forma individual, el mayor tiempo en fase de latencia lo presentó el efecto del orégano (0,12% V/V) y eugenol (0,12% V/V) para los microorganismos mesófilos, manteniéndose allí durante 14 y 7,59 días respectivamente. A su vez, la fase de latencia de los psicrótrofos en las muestras con romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) llegó hasta 7,61 días como valor máximo durante la experiencia comparando con los 1,35 días del control.

Adicionalmente, los resultados demostraron que la selección de las mezclas de antimicrobianos para los ensayos en el músculo se sustentó correctamente gracias a la determinación previa de la CFI. Esta metodología inicialmente indicó el tipo de efecto entre los compuestos antimicrobianos sobre bacterias patógenas. Asimismo, al realizar el experimento en muestras de carne, los recuentos de mesófilos, coliformes y psicrótrofos fueron más bajos en comparación con los hallados en las muestras control.

Algunos autores proponen realizar estudios de la CFI antes de ensayar compuestos antimicrobianos en alimentos. Por ejemplo, Tserennadmid y col. (2010) utilizaron aceites esenciales (rangos de CMI de 0,25-2 $\mu\text{L/mL}$) de *Citrus lemon*, *Juniperus communis*, *Origanum majorana*, y *Salvia sclarea* sobre *B. cereus* y *E. coli* encontrando efectos sinérgicos y aditivos entre algunas de las mezclas. Posteriormente, seleccionaron una mezcla sinérgica añadida a extractos de carne confirmando así una actividad potencial en el uso de mezclas binarias en el control de microorganismos. Sin embargo enfatizaron que en algunos casos la grasa y algunas proteínas presentes en las carnes pueden estar en la fase no polar y así inhibir el paso de los compuestos fenólicos en la fase acuosa donde se encuentran los microorganismos.

Resulta importante analizar otros parámetros que condicionan la vida útil del producto. Las modificaciones en el color superficial así como la evaluación sensorial de las muestras tratadas con los diferentes agentes antimicrobianos deben ser evaluadas a efectos de determinar la vida útil del producto.

4.5 Efecto de tratamientos antimicrobianos a base de aceites esenciales y ácido láctico en la conservación del color en el músculo cárneo refrigerado.

La carne cruda de animales sanos se haya sujeta a alteraciones por sus propias enzimas y las ocasionadas por microorganismos que llegan procedentes del sacrificio, manipulación y tratamiento a que se someten (Fennema, 2000). Es por ello que los aceites esenciales pueden ser una herramienta importante no solo para asegurar la calidad microbiológica de los productos cárnicos sino para mejorar o mantener el color característico de la carne fresca luego de un almacenamiento prolongado.

Luego de determinar la acción antimicrobiana de las sustancias en estudio, se evaluó la influencia de éstas en el color del músculo semitendinoso. Para ello, se prepararon muestras de 10 g de dicho músculo cárnico y se les adicionó, por separado, 1 ml de los siguientes compuestos: romero (0,12% V/V), orégano (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V), ácido láctico (0,87% V/V), romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V). Las muestras fueron colocadas en placas de Petri estériles, cerradas y almacenadas inmediatamente en cámaras de refrigeración controlada a 4 °C. Muestras refrigeradas sin adición de antimicrobianos, fueron consideradas como control. Durante el periodo de almacenamiento, se tomaron muestras a diferentes tiempos del almacenamiento y se realizaron las determinaciones de color con un Colorímetro Minolta CR300 (NJ, USA) tal como está descrito en el capítulo de materiales y métodos.

Los cambios de color se midieron por medio de los parámetros: Luminosidad (L: 100 blanco, 0 negro), abundancia de color rojo ($a^* \pm$ rojo - verde) y abundancia de color amarillo ($b^* \pm$ amarillo - azul). El parámetro con mayor importancia para la carne fresca es la abundancia de color rojo (a^*). Los cambios registrados del color durante el tiempo de almacenamiento se muestran en la Figura 7.

Como se observa en la Figura 7, en las muestras con y sin adición de tratamiento, los valores del parámetro a^* (abundancia de color rojo) disminuyeron en relación al tiempo de almacenamiento. En las muestras con adición individual de romero, orégano y eugenol, el valor promedio inicial se registró en 18, y el final se ubicó en 10, por lo tanto, se encontraron diferencias aproximadas de 8 unidades desde el día inicial hasta el día final de almacenamiento. En el caso de las muestras con ácido láctico, al día 8 de almacenamiento, los valores de a^* se mantuvieron similares a los hallados para los demás tratamientos, sin embargo, al pasar este periodo, los valores disminuyeron considerablemente, así, el valor final fue de 6,88, encontrándose diferencias de 12 unidades con respecto al día inicial.

En tanto, en las muestras con mezclas binarias (Figura 7.b) se observó que la adición de la mezcla láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V), alcanzó el mayor valor de a^* al día final de almacenamiento (11,32), así desde el día inicial al final se presentó una diferencia de 8,1 unidades. La misma diferencia se registró en las muestras con romero-orégano (0,06%/0,06%V/V), sin embargo el valor final de a^* en este caso fue de 6,23.

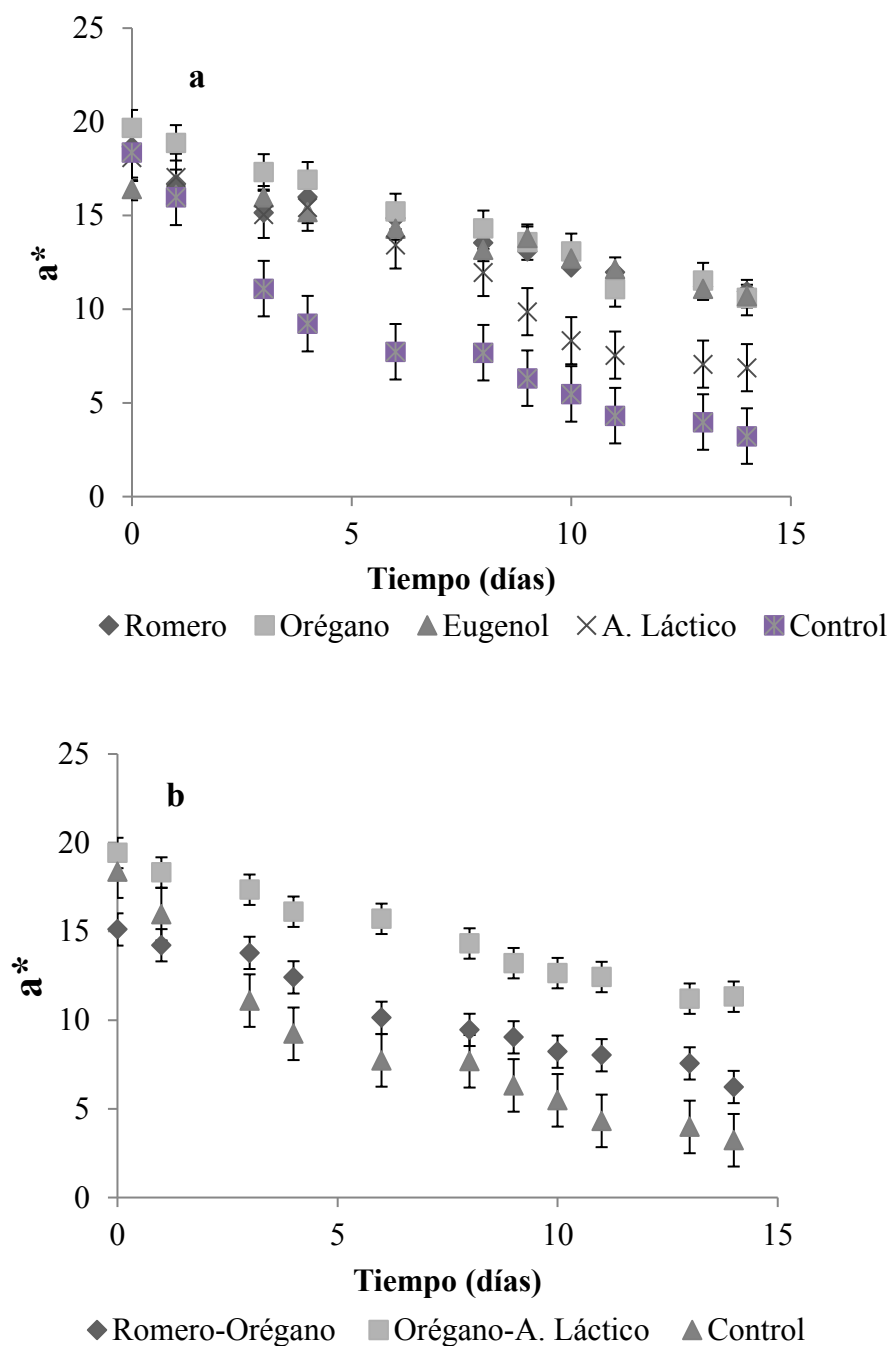


Figura 7. Modificación del parámetro a^* (color rojo) durante el tiempo de almacenamiento a 4 °C del músculo cárnico con adicción de a) Aceites de romero (0,12% V/V), orégano (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V), A. láctico (0,87% V/V) y b) romero - orégano (0,06%/0,06% V/V), láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V).

En cuanto a las muestras control, el valor inicial de a^* fue de 18,37 y el final al día 14 fue de 3,23, así se observó una diferencia de 15 unidades. Estas muestras presentaron los mayores cambios referentes al color rojo del músculo, en relación a las muestras tratadas.

Los datos fueron analizados mediante el ANOVA correspondiente; los resultados se presentan en la Tabla 7 del Anexo 2. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en los valores de a^* en relación a los tratamientos de láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V), eugenol (0,12% V/V) y romero (0,12% V/V), pero sí se presentaron diferencias significativas con los demás tratamientos de estudio.

Las muestras de carne con agregado de láctico - orégano (0,02%/0,03 %V/V), eugenol (0,12% V/V), romero (0,12% V/V), y orégano (0,12% V/V), presentaron la mayor estabilidad en los cambios del color rojo durante los 14 días de almacenamiento.

Con el objetivo de evaluar los cambios de color de la carne tratada durante la etapa de almacenamiento, se calculó el cambio de color total (ΔE) a partir de la siguiente expresión:

$$\Delta E = [(L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2]^{1/2}$$

Donde L^*_0 , a^*_0 y b^*_0 indican las lecturas en el tiempo cero y L^* , a^* y b^* indican las lecturas al final del tiempo de almacenamiento (CIE, 1978) en el día 14. Los resultados se presentan en la Figura 8.

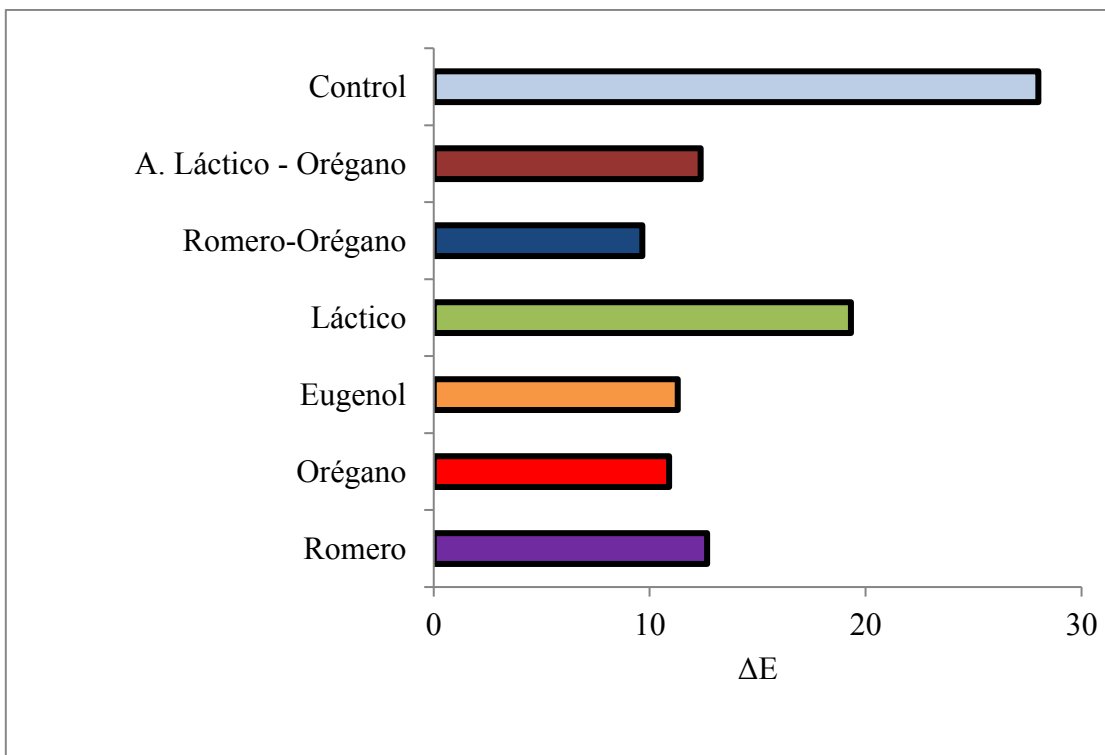


Figura 8. Modificación del Color (ΔE) en muestras de carne tratada con Aceites de romero (0,12%V/V), aceite de orégano (0,12%V/V), eugenol (0,12% V/V), A. láctico (0,87% V/V), romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V) luego de 14 días de almacenamiento a 4 °C.

De acuerdo a los resultados, se tomó como referencia en cada caso el valor de ΔE hallado en las muestras control. Su valor fue mayor en comparación con las demás muestras, ubicándose en 28 unidades. Para las muestras tratadas con aceites esenciales y mezclas binarias, los cambios de color tuvieron un valor máximo de 12,66. Por el contrario, para las muestras con ácido láctico el cambio de color fue de 19,37, sin embargo al día 9 de almacenamiento, el ΔE fue de 10,91, según lo establecido en la Figura 9. Por lo tanto, los menores cambios de color, teniendo en cuenta todos los parámetros colorimétricos, fueron encontrados en las muestras tratadas con mezclas binarias y aceites esenciales individualmente.

En la Figura 9, se pueden apreciar los cambios de color que se producen en las muestras de carne con respecto al tiempo de almacenamiento. Se puede estimar que al día 7 las muestras tratadas sufrieron cambios de color que se agruparon en un ΔE promedio de 7,35, a diferencia del control, cuyo valor fue de 13,89. Por otro lado, al día 9 de almacenamiento, los cambios de color para las carnes tratadas no superaron las 10,9 unidades.

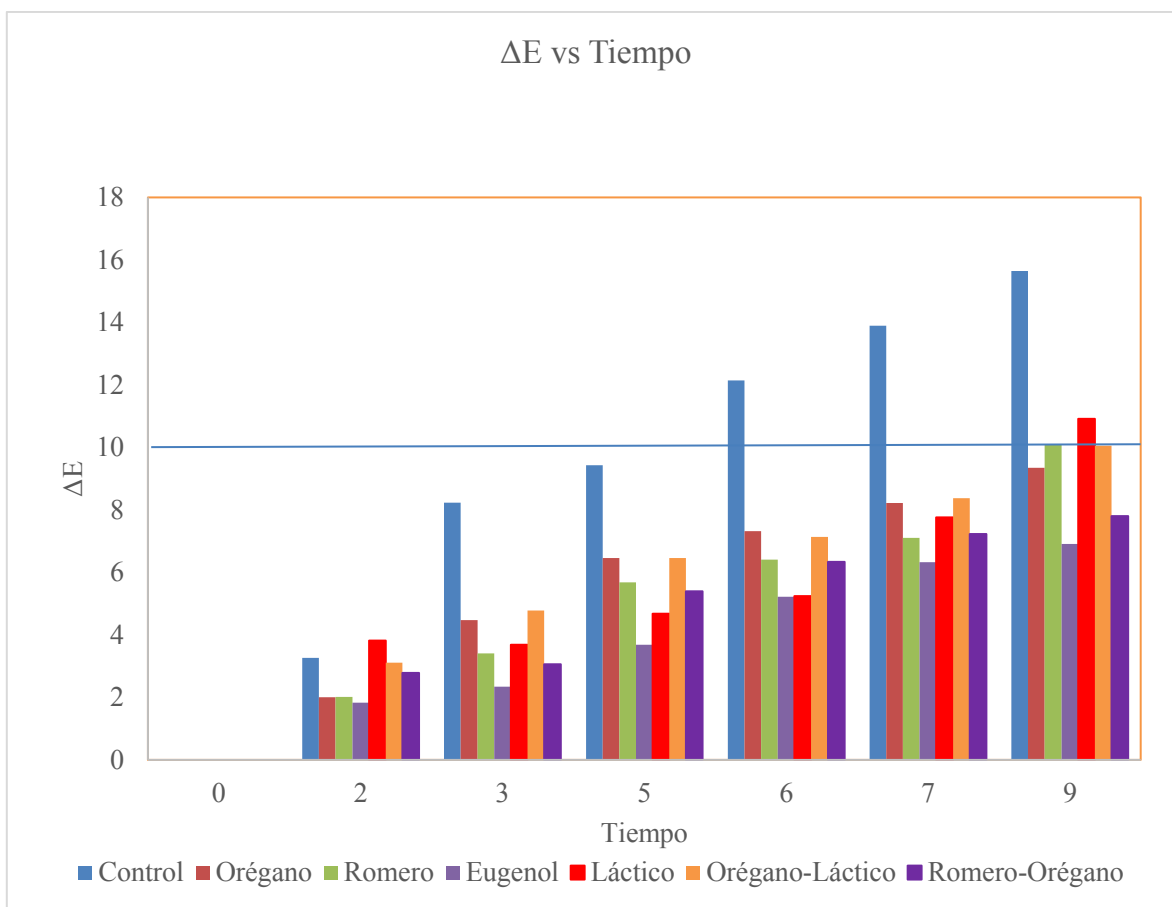


Figura 9. Cambios del Color (ΔE) durante el tiempo de almacenamiento y temperatura de 4 °C en muestras de carne tratada con Aceites de romero (0,12% V/V), aceite de orégano (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V), láctico (0,87% V/V), romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V).

En la Tabla 9 se presenta el tiempo en días de almacenamiento, hasta el cual las muestras pueden ser consideradas como aceptables, teniendo en cuenta sólo al color medido instrumentalmente. Sin embargo debe incluirse en el concepto de vida útil otros parámetros como ser la calidad microbiana y el aspecto sensorial.

Tabla 9: Tiempo en días, al cual las muestras de carne tratadas con diferentes aceites y mezclas son aceptables (ΔE menor a 10)

Tratamiento	Tiempo en días a los cuales el valor de $\Delta E < 10$
Orégano (0,12% V/V)	9
Romero (0,12% V/V)	9
Eugenol (0,12% V/V)	14
A. láctico (0,87% V/V)	9
Láctico - Orégano (0,02%/0,03 % V/V)	9
Romero - Orégano (0,06%/0,06% V/V)	9
Control	6

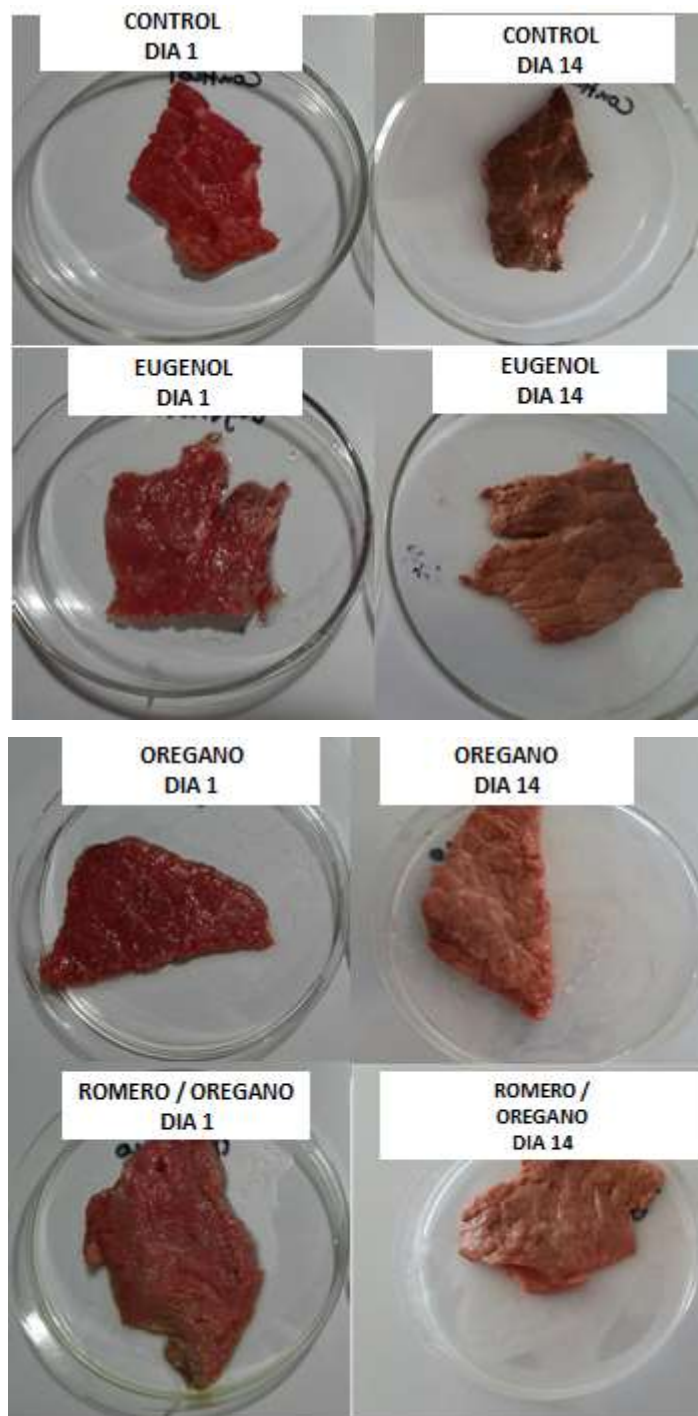
En la Figura 10 se muestran las imágenes de las muestras tratadas y sin tratar al tiempo inicial y final de almacenamiento (día 14).

Nuestros resultados coinciden con los informados por Naveena y col. (2006) quienes agregaron ácido láctico individualmente y en mezclas con orégano (0,10% V/V) y vitamina C (0,50% V/V) en carne cruda de búfalo y refrigerada a 4 °C por 12 días. Evaluaron la estabilidad del color rojo de la carne por medio de los valores del parámetro de a^* y observaron que la mezcla de láctico - orégano (2,00% V/V/0,10% V/V) presentó un rango de 10,88 a 9,22 desde el día inicial al final (día 9), mostrando así una diferencia de 1,66 unidades. Si bien, los investigadores utilizaron un músculo cárneo distinto, concluyen al igual que nosotros que el uso de ácido láctico en mezcla con aceites esenciales mantiene el color rojo del músculo refrigerado durante más tiempo. Esta es una característica fundamental en la evaluación de la calidad de la carne ya que los consumidores utilizan el color como un indicador de frescura e influye fuertemente en la decisión de compra. Además durante el almacenamiento y distribución, los procesos de oxigenación y oxidación de la mioglobina influyen en el color de la carne (Lanari y col., 2002). Por lo tanto el uso de aceites esenciales puede ser una alternativa que no solo otorgaría estabilidad microbiológica en el músculo sino también en la estabilidad del color.

Otros investigadores (Higuera, 2013; Rivaroli y col., 2016) demostraron que la aplicación de aceites esenciales añadidos a recubrimientos para el almacenamiento de la carne en refrigeración puede otorgar características como lo es la barrera a los gases, permeabilidad al vapor de agua, disminución de la tasa de respiración del alimento, creando barreras antimicrobianas y prolongando los cambios de color.

La calidad de la carne fresca al estar influenciada por el crecimiento microbiano, produce alteraciones en el olor, sabor y color. Principalmente éste último es la primera característica que se juzga. El color rojo brillante de la oximioglobina en la superficie de la carne fresca normalmente indica que, al menos la descomposición, es muy limitada (Benedict, 1975).

Investigaciones previas han demostrado que algunas hierbas y especias poseen poder antioxidante y su utilización en la elaboración de productos cárneos está limitada por la compatibilidad sensorial (Barbut, 1985). Por ejemplo Ahmad y Ahmad (2014), utilizaron aceites esenciales de semilla de uva, té verde, romero, ortiga y canela con el fin de evaluar su poder antioxidante sobre carne vacuna cruda. Efectivamente estos compuestos mostraron propiedades antioxidantes similares a los compuestos sintéticos que habitualmente se utilizan en la industria.



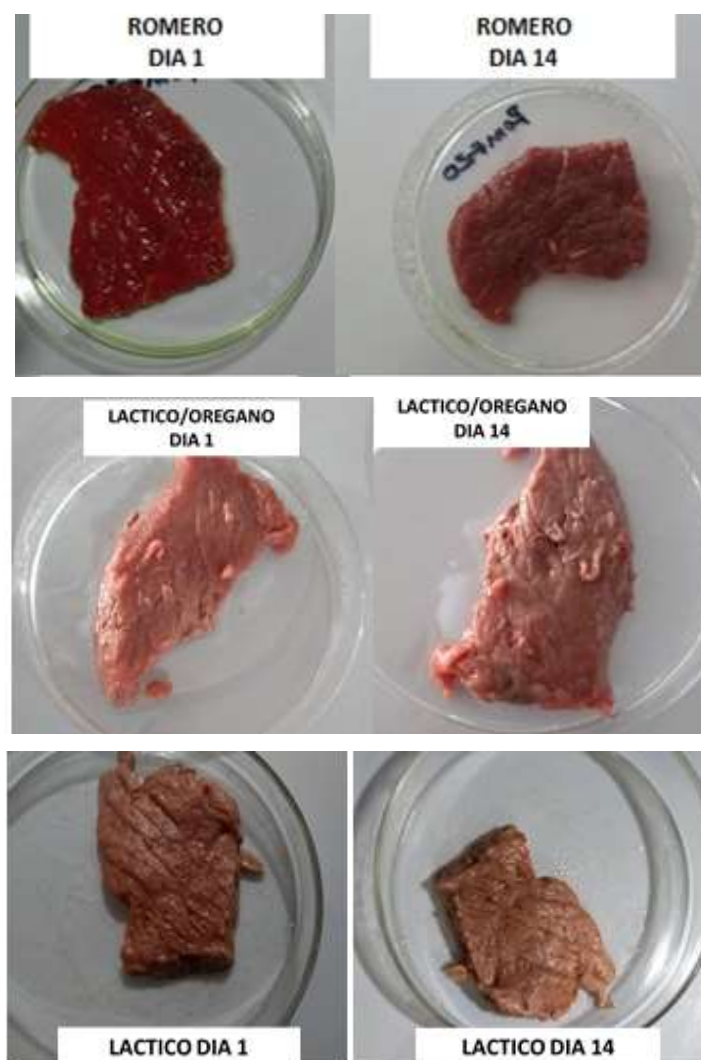


Figura 10. Cambios de color durante el almacenamiento a 4 °C de las muestras tratadas y control al día inicial y al día final de almacenamiento (día 14).

Teniendo en cuenta estas características y los resultados de nuestra investigación, podemos decir que se demostró una relación entre la calidad microbiológica que otorgaron los aceites esenciales junto con la estabilidad de los cambios de color (ΔE). Considerando la información dada en la Tabla 9, al día 9 de almacenamiento los resultados microbiológicos en las carnes tratadas tuvieron valores de entre 4 a 6 Log UFC/g, según los resultados expuestos en las Figuras 3 y 5.

Igualmente podemos afirmar que los aceites esenciales añadidos de forma individual y las mezclas de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V) produjeron pocos cambios en el color rojo de la carne durante las dos semanas de

almacenamiento, en comparación con las carnes tratadas con ácido láctico y las carnes sin adición de tratamiento, además proporcionaron una estabilidad microbiológica importante. Las carnes tratadas de forma individual con orégano, romero y eugenol (0,12% V/V), tuvieron también resultados favorables en cuanto a la estabilidad de color, dado que al día 14 de almacenamiento los cambios de color se situaron en valores cercanos a 10 y los valores de a^* al día 6 fueron cercanos a 14, siendo este valor considerable aceptable para el color rojo de las carnes frescas (Holman y col., 2017).

Investigadores como Kalhotka y col. (2013), determinaron los valores de ΔE y recuentos de microorganismos alterantes de la carne en relación a la determinación de la vida útil del músculo cárneo. En su estudio determinaron los cambios de color, ΔE del músculo vacuno almacenado en refrigeración durante 1, 3, 7 y 14 días, y concluyeron que al día 7 con recuentos de 10^7 UFC/cm² de psicrótrofos y valor de ΔE de 10,2 son parámetros aceptables para asegurar la vida útil del producto. Por otro lado, investigadores como Holman y col. (2017), establecieron umbrales colorimétricos basados en la capacidad de las medidas instrumentales para predecir la satisfacción del consumidor con el color de la carne, y encontraron que el parámetro a^* proporcionó la predicción más simple y robusta de la aceptabilidad del color de la carne, determinando que el color de la carne vacuna es aceptable cuando los valores a^* (abundancia de color rojo) son iguales o superiores a 14,5.

4.6 Análisis Sensorial

Luego de establecer la influencia de los compuestos antimicrobianos en los cambios de color del músculo almacenado durante dos semanas a 4 °C, se procedió a realizar el análisis sensorial. El ensayo se realizó con la prueba de evaluación de aceptabilidad por atributos, para conocer la existencia o no de diferencias entre los diferentes tratamientos. También se determinaron los aspectos de aceptación de las muestras tratadas.

La preparación de las muestras a ser evaluadas por el panel sensorial consistió en pesar muestras de 10g de carne fresca bovina (músculo *semitendinoso*), seguidamente se adicionó a cada muestra, separadamente, 1mL de los tratamientos antimicrobianos: romero (0,12% V/V), orégano (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V), ácido láctico (0,87% V/V), romero -

orégano (0,06%/0,06 V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V) los cuales fueron dispersados por toda la superficie. Inmediatamente se sometieron a cocción a la plancha sin agregar ningún tipo de condimento, según lo muestra la Figura 11. Otras muestras sin tratamientos antimicrobianos y sometidos a cocción, fueron consideradas como control así como está descrito en Materiales y Métodos.



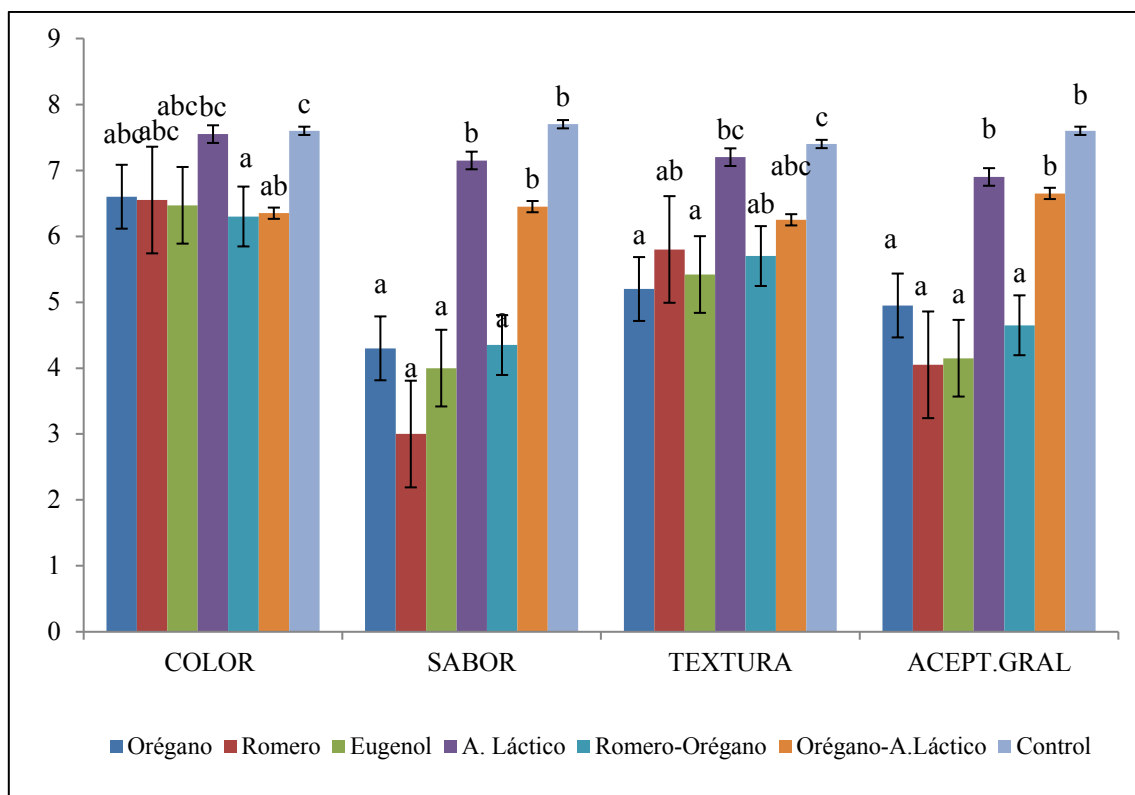
Figura 11. Muestras presentadas a los panelistas en una evaluación sensorial por atributos, se detallan el estado y el código de las muestras con tres números aleatorios.

El estudio se realizó mediante un panel no entrenado compuesto por 20 personas, que calificaron las muestras (en términos de sabor, textura, color y aceptabilidad global) utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1: no me gusta nada - 9: me gusta mucho) según lo indicado en la Figura 12. Se preparó un total de 140 muestras (7 tratamientos para 20 personas). Todos los resultados se analizaron en forma estadística a partir del ANOVA que se presenta en la Tabla 11 del Anexo 2.

EVALUACION DE ACEPTABILIDAD POR ATRIBUTOS												
Fecha: _____ Nombre: _____ Evaluador N°: _____												
Ud. recibirá cinco (7) muestras diferentes de carne asada, ordenadas al azar, codificadas con números de tres dígitos. Deberá evaluarlas por los atributos de color, sabor, textura y la aceptabilidad global. Marque con una cruz la casilla correspondiente. Evalúe todos los atributos de la primera muestra, y luego pase a la siguiente.												
MUESTRA N° _____												
	me disgusta mucho			me es indiferente			me gusta mucho					
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Textura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Aceptabilidad global	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Figura 12. Modelo de evaluación sensorial por atributos

La Figura 13 muestra la calificación promedio de las muestras cocidas con adición de Aceites de romero, orégano, eugenol (0,12% V/V), romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V) en términos sensoriales de color sabor, textura y aceptabilidad general.



Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 13. Calificación promedio de las muestras cocidas con adición de aceites de romero (0,12% V/V), orégano (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V), romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V) en términos sensoriales de color sabor, textura y aceptabilidad general.

Analizando esta Figura, todas las muestras tratadas con los compuestos de estudio, lograron puntajes de aceptabilidad correspondientes a la característica de color entre 6,5 y 7,5. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la calificación correspondiente a carnes con mezclas de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y tampoco se hallaron diferencias entre los puntajes en carnes con orégano (0,12% V/V), romero (0,12% V/V) y eugenol (0,12% V/V).

De acuerdo a la aceptabilidad en la textura, las muestras con orégano (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V) y mezcla de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) presentaron promedios de aproximadamente 6 en la escala hedónica. Las carnes con romero (0,12% V/V) y la mezcla láctico-orégano (0,02%/0,03 % V/V) tuvieron mayor calificación en cuanto a la evaluación de este parámetro. Las diferencias de medias entre los tratamientos permitieron demostrar que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$).

En tanto, en relación a la evaluación del sabor, las carnes cocidas con adición individual de ácido láctico y la mezcla láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) fueron calificadas con puntajes promedio entre 6 y 7 en la escala hedónica, por lo tanto fueron las muestras mayormente aceptadas. Es posible determinar que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$) entre las muestras procedentes de los tratamientos con ácido láctico (0,87% V/V), mezcla de láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) y el control. Tampoco hubo diferencias entre la calificación promedio en la aceptabilidad respecto al sabor en las muestras con adición individual de los aceites de orégano (0,12% V/V), romero (0,12% V/V), eugenol (0,12% V/V) y la mezcla romero - orégano (0,06%/0,06% V/V), presentando además, valores menores a 6 en sabor y en aceptabilidad global, con lo que indicó que estas muestras no fueron aceptadas. Según la escala hedónica de 9 puntos, el valor de 6 indica una categoría que significa “me gusta levemente” y el valor de 7 “me gusta moderadamente” (Drake, 2007). Es por ello que las muestras tratadas con adición individual de aceites no fueron consideradas.

Las muestras con mayores puntajes de aceptabilidad global (más de 6 en la escala hedónica) fueron las tratadas con ácido láctico y la mezcla binaria de láctico-orégano (0,02%/0,03 %V/V), así como lo muestra la Figura 10. Los resultados en la escala hedónica de aceptabilidad global coincidieron con la calificación media del sabor.

Algunos investigadores, realizaron ensayos de aceptabilidad sensorial en carnes con agregado de aceites esenciales. Por ejemplo Pelaes y col. (2018) probaron en filetes de carne cocidos con recubrimientos de aceites esenciales de orégano y romero. Usaron recubrimientos con 0,10% de éstos aceites siendo las carnes con orégano las más aceptadas.

Karabagias y col. (2011) adicionaron aceite de timol y orégano sobre muestras de carne de cordero, las cuales fueron cocidas en microondas durante 5 minutos. Las mayores concentraciones de aceite, produjeron fuertes sabores, con resultados inaceptables. Por el contrario, las muestras binarias con 0,10% de orégano y timol dieron características compatibles con el sabor de la carne comúnmente cocida.

Estos resultados coinciden con los hallados en nuestro estudio, ya que se encontró una aceptabilidad en sabor de baja calificación por parte de algunos compuestos como el aceite de orégano. Sin embargo, las muestras con la mezcla binaria de láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) y muestras con ácido láctico solo tuvieron calificaciones mayores, con

aceptabilidad global superior a 6,5. No hubo diferencias significativas con respecto al control, por lo tanto podríamos decir que hubo una compatibilidad de sabor con la carne, la cual se cocinó sin condimentos.

Skandamis y Nychas (2001) y Tsigarida y col. (2000), utilizaron aceites de orégano sobre carne vacuna (0,80% y 0,10%) y evaluaron sensorialmente mediante un panel sensorial el sabor y olor de la carne luego de su cocción. No se informaron efectos adversos sobre el sabor de la carne. Al igual que en nuestro caso, la aceptabilidad en el sabor se puede deber al contenido graso del músculo vacuno, el cual es más alto con respecto a la carne de pollo o cordero (Fennema, 2000). Esto permite que haya una mayor tolerancia a las distintas concentraciones de aceites esenciales, ya que estos se disuelven en la fase grasa, y probablemente penetran de una manera más uniformemente en el músculo. Además es posible que al haber mayor contenido graso, parte de esa grasa se pierde en la cocción y con ella los aceites retenidos.

4.7 Evaluación de vida útil

La vida útil de los alimentos, tal como los cortes vacunos frescos, puede definirse como el tiempo máximo en el que los mismos mantienen sus cualidades nutricionales, sensoriales, microbiológicas y de seguridad alimentaria por encima de un nivel considerado como aceptable por los consumidores. En tanto, el desarrollo microbiano sólo es regulado por la refrigeración y a medida que transcurre el tiempo, el color se deteriora y el crecimiento bacteriano va en franco aumento, por lo cual, la vida útil del producto es muy corta, dependiendo de la carga microbiana inicial y de la temperatura de almacenamiento. Se estima que a 5 °C, la vida útil es de 3 a 5 días (Noskova, 1978). El conocimiento de los mecanismos que producen la pérdida de la aceptabilidad permite plantear estrategias para extender la vida útil que no perjudiquen las características nutricionales y sensoriales del alimento. En las carnes vacunas frescas se sabe que las causas microbiológicas son dadas principalmente por sus condiciones óptimas en nutrientes y las pocas barreras naturales que las mismas poseen para el desarrollo de una gran variedad de microorganismos. En forma general los cortes vacunos son rechazados por los consumidores cuando su carga microbiana supera un umbral de 10^7 microorganismos por cm^2 debido a los productos que el metabolismo bacteriano genera. De esta forma se entiende que haya una relación directa

entre la vida útil y el número y tipo de microorganismos presentes en el momento inicial de la producción del corte vacuno.

Otro parámetro fundamental para asegurar la vida útil de los cortes frescos es la temperatura de refrigeración ya que tiene un efecto directo en la velocidad de crecimiento microbiano, el cual es acumulativo en el tiempo. Sin embargo, el control de estos parámetros no es suficiente para alcanzar un periodo limitado de comercialización aceptable (Phill y col., 2010). Extender en el anaquel la vida útil de los alimentos, se basa en el control de enzimas o moléculas químicamente activas en los alimentos, por lo tanto, se puede decir que cualquier aditivo que pueda extender o mantener la vida útil de un producto alimenticio puede describirse como un conservante, y el aceite esencial es tal aditivo (Adegoke y Olapade, 2012).

Por otra parte, y como se mencionó en el capítulo 4.4, la microbiología predictiva es una poderosa herramienta para la estimar de vida útil de las carnes bovinas a partir del modelado del desarrollo de los microorganismos de deterioro. La ecuación de Gompertz permitió predecir el tiempo (días) en el cual la carga microbiana alcanza el umbral de 10^7 UFC/g para las carnes almacenadas a 4 °C.

Para la presente investigación, se definió la vida útil como el tiempo en que las muestras presentan una aceptabilidad sensorial de sabor y aceptabilidad global mayor a 6,40, recuentos microbianos menores a 10^7 UFC/g ($\text{Log UFC/g días}^{-1}$), variaciones de color (ΔE) menor a 10 (Cantarero y Campos, 2017). La vida útil está determinada por la aceptabilidad sensorial global, las variaciones de color y los recuentos microbianos según el caso. Según esta definición en la Tabla 10 se presenta la vida útil de las muestras de carne bajo los diferentes tratamientos seleccionados.

Tabla 10. Tiempo de vida útil (días) de carnes tratadas dado por los valores admisibles de aceptabilidad sensorial global, recuentos microbianos y variaciones de color.

Tratamiento	Concentración	Vida Útil
A. Láctico	0,87% V/V	9 días
Láctico - Orégano	0,02 %/0,03% V/V	9 días
Control	Sin Tratamiento	3 - 2 días

De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 13, las carnes tratadas con mezclas binarias de romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) y con aceites añadidos en forma individual fueron descartadas por el panel sensorial ya que tuvieron valores menores a 6 en aceptabilidad global y sabor. Por otro lado, las carnes tratadas con ácido láctico (0,87% V/V) presentaron una vida útil aproximada de 9 días, dado que las muestras tuvieron valores de ΔE de 10, al día 9 de almacenamiento y recuentos microbianos superiores a 7,22 Log UFC/g. Las carnes tratadas con láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V), al día 9 de almacenamiento, presentaron un cambio de color (ΔE) de 10,05 unidades, en tanto al día 14 de almacenamiento, sus recuentos microbianos fueron de 6,44 Log UFC/g. Considerando que el control presentó una vida útil de 3 días bajo refrigeración, los resultados indicaron que fue posible extender tres veces la vida útil de las carnes refrigeradas con la adición de ácido láctico (0,87% V/V) y con la mezcla láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V), en comparación con la muestra sin tratar.

La presente investigación podría generar un enfoque interesante y prometedor para la optimización de las técnicas de conservación de los alimentos, teniendo en cuenta aspectos sobre la calidad en base a factores económicos. Además, es importante realizar más investigaciones en otras matrices alimentarias con el fin de ampliar el conocimiento sobre el uso de estos aditivos naturales y de su posible implementación en la industria.

5. CONCLUSIONES

Se estableció la Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales de forma individual y en mezclas sobre el desarrollo de microorganismos patógenos como *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* sp., donde el rango de concentraciones fue desde 0,06 hasta 0,25% V/V.

Se determinó la CFI y el índice CFI de las mezclas entre aceites esenciales y ácido láctico, lo cual permitió establecer el tipo de interacción que existe entre los distintos compuestos estudiados cuando se mezclan de forma binaria. El rango del Índice de CFI se encontró desde 0,14 hasta 1.

La selección de mezclas de antimicrobianos: romero - orégano (0,06/0,06% V/V) y láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) por medio de la determinación de la CFI fue acertada en el agregado de las mismas sobre el músculo cárneo refrigerado, ya que los recuentos de mesófilos totales, coliformes totales y psicrótrofos totales fueron bajos durante toda la etapa de experimentación, en comparación con los valores hallados en muestras control.

De acuerdo al estudio antimicrobiano de los aceites probados de forma individual en las muestras de carne, se concluyó que los grupos microbianos de mesófilos y coliformes, fueron los más sensibles a la acción del aceite de orégano (0,12% V/V), presentando las mayores fases de latencia y las menores velocidades específicas de crecimiento.

En cuanto a las mezclas binarias de antimicrobianos, las combinaciones láctico - orégano (0,02%/0,03 % V/V) y romero - orégano (0,06%/0,06% V/V) fueron efectivas en el control del crecimiento microbiano de mesófilos totales, coliformes totales y psicrótrofos totales presentes en el músculo cárnico.

El modelado matemático mediante la aplicación de la ecuación de Gompertz, permitió determinar parámetros como la velocidad de crecimiento, duración en fase de latencia y máxima densidad poblacional, generando la curva de crecimiento de los microorganismos, con el fin de comprender mejor el efecto inhibitorio de los tratamientos en estudio sobre los grupos microbianos autóctonos de la carne bajo el tratamiento de refrigeración.

El agregado de aceites esenciales de orégano, romero y eugenol, probados de forma individual y en mezclas sobre el músculo cárnico refrigerado a 4 °C, ayudó a mantener el color de la carne de una forma más constante y con menores cambios durante las dos semanas de almacenamiento.

De acuerdo con la evaluación sensorial, las carnes cocidas con agregado individual de ácido láctico (0,87% V/V) y con mezcla de láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) fueron calificadas con los mayores valores en la escala hedónica 6,90 y 6,65 respectivamente.

La mezcla de láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) además de generar efecto inhibitorio sinérgico sobre cepas *Salmonella* spp ATCC 18684, *S. aureus* ATCC 6538P, fue bastante efectiva en el control de la carga microbiana inicial del músculo en refrigeración durante toda la etapa de almacenamiento. Adicionalmente, dicha mezcla binaria permitió mantener el color inicial del músculo durante mayores periodos. También, la cocción de la carne con esta mezcla fue la mayormente aceptada sensorialmente por el panel evaluador. Asimismo representó la muestra con mayor calidad de vida útil según el establecido.

Las muestras con adición de ácido láctico (0,87% V/V) y con la mezcla láctico - orégano (0,02%/0,03% V/V) permitió obtener una vida útil tres veces superior a la correspondiente a la muestra control, sin tratar, en condiciones de refrigeración.

6. BIBLOGRAFÍA

- Ablonski, L. y Borach, G. (1997). *Staphylococcus aureus*. En M. P. Doyle, L. R. Beuchat y T. J. Montville (Ed.), Food microbiology: Fundamentals and Frontiers. Washington D. C: ASM Press, 353 - 375.
- Abutbul, S.; Goldhirsh, G.; Barazani, O. y Zilberg, D. (2004). Use of *Rosmarinus officinalis* L. as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). Journal of Aquaculture, 238, 97 - 105.
- Adegoke, G. O. y Olapade, A. A. (2012). Preservation of plant and animal foods: an overview. Progress in Food Preservation, First edition, 341 - 353
- Ahmad, M. S. y Ahmad, S. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. Meat Science, 98, 21 - 33.
- Alakomi, H.; Skyttä, E.; Saarela, M.; Mattila - Sandholm, T.; Latva - Kala, K. y Helander, I. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. Applied and Environmental Microbiology, 66, 2001 - 2005.
- Álvarez, M. C.; Pena, I.; Villat, M. C.; De la Sota, P.; Laporte, G.; Olivera, D.; Noia, M. y Coll Cárdenas, F. (2016). Joint application of antimicrobial agents on microbial flora chilled meat cattle. Use of mathematical models. Procedia Food Science, 7, 63 – 66.
- Alzamora, S. M.; Tapia, M. S. y Welti - Chanes, J. (1998). New strategies for minimal processing of foods. The role of multi - target preservation. Food Science and Technology International, 4, 353 - 361.
- ANOVA (1989). Super ANOVA: Assessable General Linear Modelling. Berkley, California: Abacus Concepts Inc.
- Antman, J.; Geffner, L.; Pianciola, L. y Rivas, R. (2014). Informe Especial: Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) En Argentina, 2010-2013. Área de Vigilancia de la Salud, Dirección de Epidemiología, Ministerio de Salud de la Nación; 3 - 16.
- Apostolidis, E.; Kwon, Y. I y Shetty, K. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. International Journal of Food Microbiology, 128, 317 - 324.
- Aymerich, T.; Picouet, P. A. y Monfort, J. M. (2008). Decontamination technologies for meat products. Meat Science, 78, 114–129.

- Baird - Parker, A. (1985). Microbial Ecology of Foods. In Factors affecting life and death of microorganisms, Vol 1, International Commissions on Microbiological Specifications for foods (Chapter 7. Organic Acids), Academic Press, New York, 126 -135.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. y Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils, a review. Food and Chemical Toxicology, 46, 446 - 475.
- Barbut, S. (1985). Antioxidant properties of *Rosemary oleoresin* in turkey sausage. Journal of Food Science, 50, 1356.
- Barry, A. L. (1976). The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Philadelphia, Palea and Febiger, 335.
- Bauer, K.; Garbe, D. y Surburg, H. (2001). Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. Weinheim, 293.
- Benedict, R. (1975). Effect of lipid antioxidants on the stability of meat during storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 23, 167 - 173.
- Bezi, N.; Skobibuni, M.; Dunki, V. y Radoni, A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. Phytotherapy Research, 17, 1037 - 1040.
- Blaskyk, M. y Holley, R. (1998). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth common meat spoilage and pathogenic organisms. International Journal of Food Microbiology 39, 175 - 183.
- Board, R. G. y Gould, G. W. (1991). Future prospects. In N. J. R. a. G. W. Gould. Ed. Food preservatives Glasgow: Blackie, 267 - 284.
- Buchanan, R. L. y Bagi, L. K. (1994). Expansion of response surface models for the gorth of *Escherichia coli* O157: H7 to include sodium nitrate as a variable. International Journal of Food Microbiology, 23, 317 - 332.
- Buchanan, R. L. (1991). Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. Journal of Food Safety, 11, 123 - 134.
- Burt, S. A. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223 - 253.
- Busta, F. F. y Foegeding, P. M. (1983). Chemical food preservatives. in: Block SS. Editor. Disinfection, sterilization and preservation. Philadelphia. Part Lea and Febiger, 656 - 675.
- Bustos, J. A.; Martínez, A.; Hamdan, P. y Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomed; 17, 287 - 305.

- C. E. Comunidad Europea. (2003). Opinion of the scientific Committee on Veterinary measures relating to public health on *Salmonella* in foodstuffs. En http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf
- CAA. Código Alimentario Argentino. Capítulo VI. Artículo: 247 - Alimentos Cárneos y Afines. - Actualizado al 7/2013. En: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_VI.pdf
- Caffer, M. I. y Terragno, R. (2008). Ministerio de Salud. ANLIS “Dr Carlos G. Malbrán. Instituto nacional de Enfermedades infecciosas. Departamento de Bacteriología, Servicio Enterobacterias. Manual de Procedimientos para la caracterización de *Samonella*. en: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-Levell/Manual_procedimientos_Salmonella.pdf
- Cal, K. (2006). Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. *Plant Medicine*, 72, 311 - 316.
- Campbell - Platt, G. (1995). Fermented meats - A world perspective. Ed. Black academic and professional, London, UK, 39 - 52.
- Cantarero, F. J y Campos, J. C. (2017). Evaluación de las propiedades antimicrobianas de lactato de sodio y quitosano en carne de cerdo, molida y en trozos. Proyecto de Tesis. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras.
- Carson, C. F.; Mee, B. J. y Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time - kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (6), 1914 - 1920.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2011). Minisitio sobre Enfermedades Transmitidas por Alimentos. En: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborneinfections_g_
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* Outbreaks. (2013). En <http://www.cdc.gov/salmonella/>
- Chang, L. (1998). 6° Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos, CICTA 6, Cuba.

- CIE. Commission Internationale de l'Éclairage. (1978). Recommendations on uniform colour spaces - colour difference equations, psychometric colour terms. Supplement No. 2. CIE Publication No. 15 (E - 1 - 3.1) 1971/ (TC - 1 - 3). CIE, Paris.
- Coll Cárdenas, F. (2005). Tesis De Doctorado: Modelado matemático del desarrollo microbiano en carnes bovinas. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de La Plata.
- Coll Cárdenas, F.; Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. E. (2008). Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. *Meat Science* 79, 509 - 520.
- Conner, D. E. (1993). Naturally occurring compounds. En P. Davidson and A. L. Branern, *Antimicrobials In Foods*. New York: Marcel Dekker, inc. 441 – 468.
- Cox, S. D.; Mann, C. M., y Markham, J. L. (2001). Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 492 - 497.
- CRESA. Centre de Recerca en Sanitat Animal. (2011). En: <http://www.cresa.es/granja/salmonelosis.pdf>
- Cubero, N.; Monferrer, A. y Villalta J. *Aditivos alimentarios*. (2002). Ed. Mundi - Prensa Libros, 180.
- Cudjoe, K. (1988). The Effect of Lactic Acid Sprays on the Keeping Qualities of Meat During Storage, *International Journal of Food Microbiology*, 7, 1 - 7.
- Cui, H.; Bai, M.; Marwan, M. A. y Lin, L. (2018). The antibacterial activity of clove oil/ chitosan nanoparticles embedded gelatin nanofibers against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on cucumber. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 69 - 78.
- Cutter, C. N. (2000). Antimicrobial effect of herb extracts against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* associated with beef. *Journal of Food Protection*, 63, 601 - 607.
- Cuvelier, M. E.; Berset, C. y Richard, H. (1999). Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 42, 665 - 669.
- Davidson, M. y Parish, M. E. (1989). *Antimicrobials in Food*, Third Edition, Chapter 21. Methods for Activity Assay and Evaluation of Results, 659-680.
- Davidson, P. M. y Harrison. M. A. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*, 56, 69 - 78.

- Davies, A. R y Board, R. G. (1998). Microbiology of Meat and Poultry. Ed. Springer, 4 - 6.
- De Azeredo, G. A.; Stamford, T. L. M.; Nunes, P. C.; Neto, N. J. G.; De Oliveira, M. E. G. y De Souza, E. L. (2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. Food research international, 44, 1541-1548.
- De Barros, J. C.; Da Conceição, M. C.; Gomes, N. J.; Vieira da Costa, A.; De Souza, E. (2012). Combination of *Origanum vulgare* L. essential oil and lactic acid to inhibit *Staphylococcus aureus* in meat broth and meat model. Brazilian Journal of Microbiology 43, 1120 - 1127.
- De Medeiros Barbosa, I.; Da Costa Medeiros, J.; Arabe, K.; Justino, N.; Fachine, J.; Tavares, B.; Magnani, M. y Leite De Souza, E. (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables. Food Control 59, 468 - 477.
- Delgado, B.; Fernandez, A. y Periago, P. (2003). Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. Food Microbiology, 21, 327 - 334.
- Di Pasqua, R.; Betts, G.; Hoskins, N.; Edwards, M.; Ercolini, D. Y Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 4863 - 4870.
- Dimitrijevic', S.; Mihajlovski, K.; Antonovic', D.; Milanovic' - Stevanovic', M. y Mijin, D. (2007). A study of the synergistic antilisterial effects of a sub - lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. Food Chemistry, 104, 774 - 782.
- Drake, M. A. (2007). Sensory analysis of dairy foods. Journal of Dairy Science, 11, 4925 - 4937.
- Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. Journal of Applied Bacteriology, 54, 383.
- Eklund, T. (1989). Organic acids and esters. In: Grahame W. Gould (Ed) Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures, Elsevier Applied Science, London and New York, 161 - 200.

- Elgayyar, M.; Draughon, F. A.; Golden, D. A. y Mount, J. R. (2000). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64, 1019 - 1024.
- Eliopoulos, G. M. y Moellering, R. C. (1991). Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. *Antibiotics In Laboratory Medicine*. Baltimore, Md.: Williams and Wilkins, 406 - 432.
- Exarchou, V.; Nenadis, N.; Tsimidou, M.; Gerothanassis, I. P.; Troganis, A. y Boskou, D. (2002). Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5294 - 5299.
- Faustman, C.; Sun, Q.; Mancini, R. y Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. *Meat Science*, 25, 86-94.
- Feldhusen, F.; Kirschner, T.; Koch, R.; Giese, W. y Wenzel, S. (1995). Influence on meat colour of spray - chilling the surface of pig carcasses. *Meat Science*, 40, 245–251.
- Fennema, O. R. (2000). *Química de Los Alimentos*. Ed. Acribia, S. A., 43 - 55.
- Fernández - López, J.; Zhi, N.; Aleson - Carbonell, L.; Pérez - Álvarez, J. A.; Kuri, V. (2004). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371 - 380.
- FIFRA, Federación de Industrias Frogoríficas Regionales Argentina. (2018). Cambios en el Stock Argentino. *Revista Agrositio*. En <https://www.agrositio.com.ar/noticia/199667> - cambios - en - el - stock – vacuno.
- Figueroa, G. y Navarrete, W. P. (2002). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista médica*. Chile 130 N.8, 34.
- Filgueiras, C. T. y Vanetti, M. C. D. (2006). Effect of eugenol on growth and Listeriolysin O production by *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49, 405 - 409.
- Franzios, G.; Mirotsou, M.; Hatziapostolou, E.; Kral, J.; Scouras, Z.G. y Mavragani - Tshipidou, P. (1997). Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2690 - 2694.

- Fratianni, F.; De Martino, L.; Melone, A.; De Feo, V.; Coppola, R. y Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75, M528 - M535.
- Frazier W. C. y Westhoff D. C. (1993). *Microbiología de Alimentos*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza España, 117, 550, 560.
- Frazier, W. C. (1976). *Microbiología de alimentos*. Ed. Acribia, 167.
- Friedly, E. C.; Crandall, P. G.; Ricke, S. C.; Roman, M.; O'Bryan, C. y Chalova, V. I. (2009). *In vitro* antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. *Journal of Food Science*, 74, M67 - M72.
- Fura, C.; Arosemena, E. y Calvo, M. (2007). *Salmonella*, actualidad desde Siempre. Ed. Revista Escuela de Avicultura, 12 - 22.
- García - Gimeno, R. M. y Cosano G. Z. (1994). Modelamiento predictivo del crecimiento microbiano en los alimentos. *Alimentaria*. Octubre, 85 - 88.
- García, J. A.; Cantón, R.; García, J. E.; Gómez - Lus, M. L.; Martínez, L. y Rodríguez - Avial, C. (2002). Métodos Especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 142 - 167.
- García, R.; Lopez - Malo, A. y Palou, R. (2010). Bactericidal Action of Binary and Ternary Mixtures of Carvacrol, Thymol, and Eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*, 76, 2.
- Gavahian, M.; Farhoosh, R.; Javidnia, K.; Shahidi, F.; Golmakani, M. T. y Farahnaky, A. (2017). Effects of electrolyte concentration and ultrasound pretreatment on ohmicassisted hydrodistillation of essential oils from *Mentha piperita* L. *International Journal of Food Engineering*, 13, 10 - 12.
- Giannuzzi, L. y Zaritzky, N. (1991). The effect of Packaging Film on the shelf - life of treated refrigerated pre - peeled potatoes. *Packaging Technology and science*. Vol 4, Issue 2, 69 -76.
- Giannuzzi, L.; Pinotti, A. y Zaritzky, N. (1998). Mathematical modeling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 101 - 110.

- Gibson, A. M. y Roberts, T. A. (1989). Predicting microbial growth: Development of a mathematical model to predict bacterial growth responses. *Food Australia*, 41, 1075 - 1079.
- Gibson, A. M.; Bratchell, N. y Roberts, T. A. (1988). The effect of sodium chloride and temperature on rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology*, 62, 479 - 490.
- Gill, A. O. y Holly, R. A., (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 1 - 9.
- Gill, A. O; Delaquis, P.; Russo, P. y Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 83-92.
- Goncalves, A. C.; Almeida, R. C. C.; Alves, M. A. O. y Almeida, P. F. (2005). Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *L. monocytogenes* populations on chicken breast meat. *Food Control*, 16, 617 - 622.
- Goñi, M. V.; Beriain, M. J.; Indurain, G. y Insausti, K. (2007). Predicting longissimusdorsi texture characteristics in beef based on early post - mortem colour measurements. *Meat Science*, 76, 38 - 45.
- Goñi, P.; López, P.; Sánchez, C.; Gómez, R.; Becerril, R. y Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116, 982 - 989.
- Gutiérrez, J.; Barry, R. y Bouke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy synergistic potential and interaction with food components. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 142 - 150.
- Hammer, K. A.; Carson, C. F. y Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985 - 990.
- Hao, Y. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by Plant Extracts in refrigerated Cooked Beef. *Journal of Food Protection*, 61, 307 - 312.
- Helander, I. M.; Von Wright, A. y Mattila - Sandholm, T. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram - negative bacteria. *Trends Food Science Technology*, 8, 146 - 150.

- Helander, I. M.; Alakomi, H. L.; Latva - Kala, K.; Mattila - Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E.J.; Gorris, L. G. M. y Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gramnegative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590 - 3595.
- Herrera, B. L. (2005). La industria de la carne bovina en Centroamérica: Situación y perspectivas. Ed. Servicios Internacionales para el Desarrollo Empresarial S.A. Proyecto “mejoramiento de la productividad, Calidad, inocuidad y comercio de la carne en Centro América”, 43.
- Higuera, M. C. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana de un recubrimiento a base de aceite esencial de limón utilizado en carne cruda. *Industrias Cárnicas*. En: <http://procesosindustriales - carnicos.blogspot.com/2013/06/evaluacion - de - la - capacidad.html>.
- Hirshfield, I. N., Terzulli, S. y O'Byrne, C. (2003). Weak acids: a panoply of effects on bacteria. *Science Progress*, 86, 245 - 269.
- Holman, B. W.; Van de Ven, R. J.; Mao, Y.; Coombs, C. E y Hopkins, D. L. (2017). Using instrumental (CIE and reflectance) measures to predict consumers acceptance of beef colour. *Meat Science*. 127 -157.
- Honório, V. G.; Bezerra, J.; Souza, G. T.; Carvalho, R. J.; Gomes-Neto, N. J.; Figueiredo, R. C.; Melo, J. V. y Souza, E. L. (2015). Magnani, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. *Frontiers in Microbiol*, 6, 1223.
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1996). *Microbial Ecology of Foods*. (Chapter 5, Microorganisms in foods). Microbiological Specifications of food Pathogens. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1983). *Microbial Ecology of Foods*. (Chapter 15, Meat and meat products). Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1986). *Microbial Ecology of Foods*. (Chapter 3 Microorganisms in foods). Samplings for Microbiological analysis. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.

- INEI. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. (2005). Servicio Enterobacterias, Departamento Bacteriología. ANLIS Boletines Epidemiológicos del Ministerio de Salud de la Nación Evolución de las infecciones humanas por *Salmonella* spp. en Argentina. En: http://msal.gov.ar/htm/site/sala_situacion/PANELES/boletines/boletin_BEP30.pdf
- Ingram, M.; Ottoway, F. y Coppock, J. (1956). The preservation action of acid substances in Food Chemistry Journal, 42, 1154 - 1163.
- Ipek, E.; Zeytinoglu, H.; Okay, S.; Tuylu, B.A.; Kurkcuoglu, M. y Husnu Can Baser, K. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/ microsomal test. Food Chemistry, 93, 551 - 556.
- Jarrar, N.; Abu - Hijleh, A. y Adwan, K. (2010). Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine (2010) 121-123.
- Jay, J. M. (1994). Microbiología Moderna de los Alimentos. Zaragoza: España: Ed. Acribia.
- Jirovetz, L.; Buchbauer, G.; Stoilova, I.; Stoyanova, A.; Krastanov, A. y Schmidt, E. (2006). Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. Journal of Agricultural Food Chemistry, 54, 6303 - 6307.
- Juhee, A.; Ingolf, U. y Grun, M. (2005). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. Food Microbiology 24, 7 - 14.
- Kalembe, D. y Kunicke, A. (2003). Antibacterial and antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry Ed. 10, 1813 - 829.
- Kalhotka, L.; Villagomez, J.; y Plevová, S. (2013). Dynamic changes of selected microbiological and physical parameters in fresh jointed beef. Maso International Volume 01/2013.
- Kaplan, M. H. y Tenebaum, M. J. (1982). *Staphylococcus aureus*: Cellular Biology and Clinical applications. Ed. The American Journal of Medicine. 72; 248
- Karabagias, I.; Badeka, A. y Kontominas, M. G. (2011). Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. Meat Science 88, 109 - 116.
- Katarzyna, Ś.; Hnatyk, N.; Daszkiewicz, T.; Kubiak, D. y Matusevičius, F. (2015). The effect of vacuum cold storage on the quality of meat from polish Holstein, friesland black,

and white heifers and limousin crosses. Veterinarija Ir Zootechnika (Vet Med Zoot). T. 70. 1392 - 2130.

- Knobloch, K.; Pauli, A.; Iberl, B.; Weigand, H. y Weis, N. (1989). Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. Journal of Essential Oil Research, 1, 119 - 128.
- Kokkini, S.; Karousou, R.; Dardioti, A.; Krigas, N. y Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. Phytochemistry, 44, 883 - 886.
- Koutsoumanis, K. ; Lambropoulou, K. y Nychas, G. J. F. (1999). A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. International Journal of Food Microbiology, 49, 63 - 74.
- Kumar Sahoo, R.; Kuanar, A.; Kumar Joshi, R.; Das, A. P.; Nayak, S. y Subudhi, E. (2011). Anti-dermatophytic activity of eucalyptol rich turmeric somaclone oil against human pathogenic isolates. Journal of Medicinal Plants Research, 5, 1594–1597.
- Kumar - Trivedi, M.; Shrikant, P.; Michra, R.K. y Snehasis, J. (2015). Structural and physical properties of biofield treated thymol and menthol. Journal of Molecular Pharmaceutics and Organic Process, 2, 1–10.
- Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P. y Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91, 453 - 462.
- Lanari, M. C. (1988). Modificaciones de la textura y coloración superficial de carnes bovinas refrigeradas y congeladas. Tesis Doctoral. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos, CIDCA. UNLP.
- Lanari, M. C.; Brewster, M.; Yang, A. y Tume, R. K. (2002). Pasture and grain finishing affect the color stability of beef. Journal of Food Science, 67, 2467 - 2473.
- Lawrie, R. (1977). Meat Science, 2nd ed. Edit. Acribia, Zaragoza, España, 109 - 120.
- Lee, G.; Kim, Y.; Kim, H.; Beuchat, L. R. y Ryu, J. H., (2018). Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts. International Journal of Food Microbiology, 265, 49 - 54.
- León - Cruz, R.; Palou, E. y López - Malo, A. (2003). *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* inhibition with ternary mixtures of thymol, carvacrol and potassium sorbate. Paper

presented at the Intl.Assoc, for Food Protection (IAFP) Annual Meeting. New Orleans, L. A.

- Li, Y.; Fabiano - Tixier, A. S.; Chemat, F. y Chemat, F. (2014). Essential oils: From conventional to green extraction. Essential Oils as Reagents In Green Chemistry, 9 - 20.
- Lin, Y. T.; Kwon, Y. I.; Labbe, R. G. y Shetty, K. (2005). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6, 453 - 458. (a)
- Lin, Y. T.; Kwon, Y. I.; Labbe, R. G. y Shetty, K. (2005). Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. Applied and Environmental Microbiology, 72, 8558 - 8564. (b)
- Lin, Y. T.; Labbe, R. G. y Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. Applied and Environmental Microbiology, 70, 5672 - 5678.
- López, R. y Casp, A. (2004). Tecnología de mataderos. Ed. Mundi - Prensa Libros S.A.
- Lorenzo - Leal, A. C.; Palou, E. y López - Malo, A. (2019). Evaluation of the efficiency of allspice, thyme and rosemary essential oils on two foodborne pathogens in in-vitro and on alfalfa seeds, and their effect on sensory characteristics of the sprouts. International Journal of Food Microbiology, 295, 19-24
- Mancini, R. A. y Hunt, M. C. (2005). Current research in meat color. Meat Science, 71 (1), 100 - 121.
- Marianski, S. y Marianski, A. (2010). Home Production of Quality Meats and Sausages. Ed. Bookmagic LLC. Food Safety. Chapter 8, 105 - 106.
- Mastromatteo, M.; Lucera, A.; Sinigaglia, M. y Corbo, M. R. (2009). Combined effects of thymol, carvacrol and temperature on the quality of non - conventional poultry patties. Meat Science, 83, 246 - 254.
- McCue, P.; Lin, Y. T.; Labbe, R. G. y Shetty, K. (2005). Characterization of the effect of sprouting and solid - state bioprocessing by dietary fungus on the antibacterial activity of soybean extracts against *Listeria monocytogenes*. Food Biotechnology, 19, 121 - 136.
- McMeekin, T. A. y Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge - based framework for change management. International Journal of Food Microbiology, 78, 133 - 153.

- Mejlholm, O. y Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27 - 31.
- Miazzo, D. y Pisani, L. (2015). Actualidad, propuestas y futuro. La producción de carne en Argentina. En: http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/origenes_evolucion_y_estadisticas_de_la_ganaderia/172-carnes_argentinas_final.pdf.
- Michelena, G. (2008). Producción Segura de Cárneos y Lácteos - Análisis de la Contaminación. Laboratorio Central de Salud Pública, Instituto Biológico “Dr Tomas Berón”. En: <http://www.ms.gba.gov.ar/sitios/laboratorio/files/2012/06/ProduccionCarneosLacteos.pdf>.
- Mohino, A. (1984). Aditivos en productos cárnicos: aspectos generales e industriales. *Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos*, España 151, 21.
- Moreira, M. R.; Ponce, A. G.; Del Valle, C. E. y Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Science and Technology International*, 38, 565 - 570.
- Naveena, B. M.; Muthukumar, M.; Sen, A. R. y Babji, T. R. (2006). Murthy Improvement of shelf - life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. *Meat Science*, 74, 409 - 415.
- Nazer, A. I.; Kobilinsky, A.; Tholozan, J. L. y Dubois - Brissonnet, F. (2005). Combination of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sv, typhimurium*: a synergistic effect. *Food Microbiology*, 22, 391 - 39.
- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, approved standard Fifth Edition.
- Nikaido, H. (1996). Outer membrane. In F. C. Neidhardt, et. al. (Ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd Ed., vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D. C, 29 - 47.
- Noskova, G. (1978). Microbiología de las carnes conservadas por el frío. Editorial Acribia. España.
- Ockerman, H. W. y Basu, L. (2004). Carcass chilling and boning. In J. Werner Klinth (Ed.), *Encyclopedia of Meat Sciences* Oxford: Elsevier, 144–149.

- Oliveira, D.; Melo F.; Balogun, S.; Flach, A.; De Souza, E.; De Souza, G.; Rocha, N.; Da Costa, L.; Soares, I.; Da Silva, L. y Ascêncio, S. (2015). Antibacterial mode of action of the hydroethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. involves bacterial membrane perturbations. *Journal of Ethnopharmacol*, 172, 356 - 363.
- Oliveira, C. E. V.; Stamford, T. L. M.; Gomes Neto, N. J. y de Souza, E. L. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat model using synergies. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 312 - 316.
- Oluwatuyi, M.; Kaatz, G. W. y Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry* 65, 3249 - 3254.
- OMS. Organización Mundial de La Salud. (2011). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Nota descriptiva N°125. Diciembre de 2011. En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>.
- Ortuño, M. F. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyana Ediciones, 151 - 156.
- Oussalah, M.; Caillet, S.; Saucier, L. y Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 414 - 420).
- Pahissa, A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Ed. Marge Medical Books, 18 -24.
- Pandima, D. K.; Arif, N. S.; Sakthivel, Y. y Karutha, P. S. (2010). Eugenol (an essential oil clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 107 - 115.
- Pascual, M. y Calderón, V. (1999). Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Ed. Díaz de Santos, 219 - 223.
- Pascual, M. R. (2005). Enfermedades de origen alimentario: Su prevención. Ed Díaz - Santos, 41 - 80.
- Paster, N.; Juven, B. J.; Shaaya, E.; Menasherov, M.; Nitzan, R.; Weisslowicz, H. y Ravid, U. (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 11, 33 - 37.

- Paster, N.; Menashero, M.; Ravid, U. y Juven, B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, 58, 81 - 85.
- Pelaes, A.; Guerrero, A.; Barbosa, A.; Kempinska, C.; De Oliveira, J.; Saryb, C.; Rogelio, T.; Campoc, M. y Nunes, I. (2018). Consumer profile and acceptability of cooked beef steaks with edible and active coating containing oregano and rosemary essential oils. *Meat Science*, 143, 153 - 158.
- Phill, M.; Osana, M. y Rodríguez, H. (2010). Determinación de la vida útil en Cortes bovinos Mayor Calidad por Más Tiempo. Instituto de Tecnología de Alimentos INAT Castelar, 157 - 162.
- Presser, K. A.; Ratkowsky, D. A. y Ross, T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH, lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2355 - 2360.
- Ray, B. y Sandine, W. E. (1992). Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. In B. Ray, and Mark Daeschel (Ed.), *Food preservatives of microbial origin*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 103 - 136.
- Rivaroli, D. C.; Guerrero, A.; Velandia Valero, M.; Zawadzki, F.; Eiras, C. E.; Campo, M.; Sañudo, C.; Mendes, J. A. y Nunes do Prado, I. (2016). Effect of essential oils on meat and fat qualities of crossbred young bulls finished in feedlots. *Meat Science*, 121, 278–284.
- Rivera, J.; Crandall, P. P.; O'Bryan, C. y Ricke, S. (2014). Essential Oils as antimicrobials in food systems. *Food Control Journal*, 54, 111 - 119.
- Rodríguez, M. (2003). Desarrollo y validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial de productos cárnicos. Tesis doctoral Universidad de Córdoba.
- Rosato, A.; Piarulli, M.; Corbo, F.; Muraglia, M.; Carone, A. y Vitali, M. E. (2007). *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current Medical and Chemistry*, 17, 3289 - 95.
- Rota, C.; Carramiñana, J. J.; Burillo, J. y Herrera, A. (2004). *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 1252 - 1256.

- Ruíz de Huidobro, F.; Miguel, E.; Blázquez, B.; Onega, E. (2005). A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Science*, 69, 527-536.
- Sakkas, H. y Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 429–438.
- Sánchez, J.; Jiménez, S.; Marfil, R. y Jodral, M. (2011). Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino: Fundamentos De Seguridad Alimentaria. Ed. Díaz de Santos, 24.
- Sandel, M. K. y Mckilli, J. L. (2004). Virulence and Recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the Food Industry using traditional approaches. *Food Control*; 15, 5 - 10.
- Sarikurkcu, C.; Zengin, C.; Oskay, M.; Uysal, M.; Ceylan, R. y Aktumsek, A. (2015). Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. *Industrial Crops and Products*, 70, 178–184.
- Shah, B.; Davidson, P. y Zhong, Q. (2013). Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 53-59.
- Shelef, L. A. (1983). Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6, 29 - 44.
- Shelef, L. A.; Jyothi, E. K. y Bulgarelli, M. A. (1984). Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage - containing broth and foods. *Journal of Food Science*, 49, 737 - 740.
- Shetty, K. y Lin, Y. T., (2005). Phenolic antimicrobials from plants for control of bacterial pathogens, In: Shetty, K.; Paliyath, G.; Pometto, A. L.; Levin, R. E. (Eds.), *Food Biotechnology*, 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, 1481 - 1505.
- Shylaja, M. R. y Peter, K. V. (2004). The functional role of herbal spices. In: Peter, K.V. Ed. *Handbook of herbs and spices*, Vol. 2. England: Woodhead Publishing Limited.
- Signorini, M. L. (2008). Modelo matemático predictivo del crecimiento de *Escherichia coli* O157 en carne vacuna. *Investigación Veterinaria*, 8, 47 - 57.
- Sikkema, J.; Debont, J. A. M. y Poolman, B. (1995). Mechanisms Of Membrane Toxicity Of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59, 201 - 222.

- SIRVETA. Sistema Regional para la vigilancia de Enfermedades transmitidas por Alimentos. Informe de consulta técnica. 27 - 31 de marzo de 2000. INPPAZ/OPS/OMS. En: [http://: www.infopanalimentos.org](http://www.infopanalimentos.org).
- Skandamis, P. N. y Nychas, G. J. E. (2000). Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1646 - 1653.
- Skandamis, P. N. y Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico - chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011 - 1022.
- Smeti, S.; Atti, N.; Mahouachi, M. y Muñoz, F. (2013). Use of dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oils to increase the shelf life of Barbarine light lamb meat. *Small Ruminant Research*, 113, 340 - 345.
- Smith - Palmer, A.; Stewart, J. y Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463 - 470.
- Solomakos, N.; Govaris, A.; Koidis, P. y Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science*, 80, 159 - 166.
- Soultos, N.; Tzikas, Z.; Christaki, E.; Papageorgiou, Z. y Steris, V. (2009). The effect of dietary oregano essential oil on microbial growth of rabbit carcasses during refrigerated storage. *Meat Science*, 81, 474 - 478.
- Stashenko, E. (2010). *Lippiaoriganoides* chemotype differentiation based on essential oil GC - MS and principal component analysis, *Journal of Separation Science*, 33, 93 - 103.
- Stepanovic, S.; Antic, N.; Dakic, I. y Svabic - Vlahovic, M. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiological Research*, 158, 353 - 7.
- Stratako, A. y Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. In V. R. Preedy M. Pateiro et. al. *Food Research International*, 113, 156 - 166 165.

- Tantaoui - Elaraki, A. (2005). The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *Rosmarinus officinalis* and Eucalyptus globules. African Journal of Biotechnology, 4, 1175 - 1176.
- Tassou, C. C.; Koutsoumanis, K. y Nychas, G. J. E. (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Research International, 33, 273 - 280.
- Tavakolpour, Y.; Moosavi - Nasab, M.; Niakousari, M.; Haghighi - Manesh, S.; Hashemi, S. M. B. y Mousavi Khaneghah, A. (2017). Comparison of four extraction methods for essential oil from *Thymus daenensis* subsp. *lancifolius* and chemical analysis of extracted essential oil. Journal of Food Processing and Preservation, 41, 156–162.
- Teotia, J. S. (1974). Chemical pasteurization of poultry meat. Dissertation Abstracts International, 34, 41 - 42.
- Terzi, G. y Gucukoglu, A. (2010). Effects of Lactic Acid and Chitosan on the Survival of *V. parahaemolyticus* in Mussel Samples. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9, 990 - 994.
- Tienungoon, S.; Ratkowsky, D.; McMeekin, T. y Ross, T. (2000). Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. Applied and Environmental Microbiology, 66, 4979 - 4987.
- Toldrá, F. (2009). Safety of Meat and Processed Meat. Ed. Springer, 3 – 11.
- Torres, A. (2010). Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science Publishers, 01, 122 - 141.
- Tserennadmid, R.; Takó, M.; Galgóczy, L.; Papp, T.; Vágvölgyi, Cs.; Gerő, L. y Krisch, J. (2010). Antimicrobial effects of essential oils and interaction with food components. Central European Journal of Biology, 5, 641 - 648.
- Tsigarida, E.; Skandamis, P.; Nychas, G. J. E., (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. Journal of Applied Microbiology, 89, 901 - 909.

- UE. Diario Oficial de la Union Europea: Reglamento No 101/2013 de la Comisión de 4 de febrero de 2013. Relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos. En: <http://www.higieneambiental.com/sites/default/files/images/pdf/reglamento - ue - 101 - 2013 - acido - lactico.pdf>.
- Ultee, A.; Kets, E. P.; Alberda, M.; Hoekstra, F. A. y Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food - borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Archives of Microbiology, 174, 233 - 238.
- Van de Braak, S. A. A. J. y Leijten, G. C. J. J. (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 116.
- Velázquez, M. E. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Revista Salud pública. México, 47, 381 - 387.
- Wallace, J. (2004). Symposium on “Plants as animal foods: a case of catch 22” Antimicrobial properties of plant secondary metabolites.
- Wendakoon, C. N. y Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. Journal of Food Protection, 58, 280 - 283.
- Whiting, R. C. y Masana, M. O. (1994). *Listeria monocytogenes* survival model validated in simulated uncooked - fermented meat products for effects of nitrite and pH. Journal of Food Science, 59, 760 - 762.
- WHO, World Health Organization. (1997). Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. Emerging Infectious Diseases Journal 3, 223 - 228.
- WHO, World Health Organization. (2003). Global Salm - Surv, A Global *Salmonella* surveillance and laboratory support project, 4 - 10.
- Xiao - Fang, T.; Fei, H.; Kiran, T.; Xiao-Li, L.; Ying-Shuo, Z. y Zhao-Jun, W. (2018). Comparison of antibacterial effects and fumigant toxicity of essential oils extracted from different plants. Industrial Crops and Products, 124, 192 - 200.
- Yap, P. S; Lim, S. H; Hu, C. P. y Yiap, B. C. (2013). Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid - conferred multidrug resistant bacteria. Phytomedicine, 20, 710 - 713.

- Yúfera, E. P. y Carrasco - Dorriern, J. M. (1977). Química Agrícola II. Ed. Alambra. España.
- Yúfera, E. P. (1970). Química Agrícola I. Alimentos. Editorial Alhambra, 536.
- Zaika, L, (1998). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. Journal of Food Safety, 9, 97 - 118.
- Zengin, H. y Baysal, A. H. (2014). Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage - forming bacteria and cell structure - activity relationships evaluated by SEM microscopy. Molecules, 19, 17773 - 17798.
- Zwietering, M. H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F. M. y Van't Riet, K. (1990). Modelling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology, 56, 1875 - 1881.

7. ANEXOS

Anexo 1

Resultados estadísticos del desarrollo de los diferentes grupos de microorganismos en las condiciones de estudio (SigmaPlot 11,0)

Tabla 1a. Análisis de varianza para el recuento de aerobios mesófilos en el músculo con adición de todos los compuestos antimicrobianos en estudio, Comparación múltiple (Fisher LSD Method):

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD. ERROR	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO (0,12% V/V)	4,383	0,895	0,27	0,601	AB
ORÉGANO (0,12% V/V)	3,376	0,174	0,0525	0,117	A
EUGENOL (0,12% V/V)	5,215	1,573	0,474	1,057	BC
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	6,123	1,615	0,487	1,085	C
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 % V/V)	5,226	1,474	0,444	0,99	BC
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	5,006	1,353	0,408	0,909	BC
CONTROL	6,622	1,534	0,463	1,031	D
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	6	75,64	12,61	7,19	<0,0001
TRATAMIENTO	6	75,64	12,61	7,19	<0,0001
ERROR	70	122,72	1,75		
TOTAL	76	198,35			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 1b. Análisis de varianza para la Ecuación Gompertz (recuento de Aerobios Mesófilos)

Aceite de Romero (0,12% V/V)

VARIABLE	COEFICIENTE		STD error	T	P
c	3,9461		1,1812	3,3407	0,0001
b	0,1635		0,0563	2,9038	0,0001
m	9,1896		1,5958	5,7588	0,0001
y0	3,2551		0,1466	22,208	0,0001
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA REGRESION	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
	3	7,9283	2,6428	214,2577	0,0001
	7	0,0863	0,0123		
	10	8,0146	0,8015		

Aceite de Orégano (0,12% V/V)

Acetato de Glicerilo (6,12% v/v)					
VARIABLE	COEFICIENTE		STD error	T	P
y0	3,1256		0,0319	98,0111	0,0001
a	0,0349		0,0038	9,2949	0,0001
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	1	0,275	0,275	86,3948	0,0001
RESIDUAL	9	0,0286	0,0032		
TOTAL	10	0.3037	0.0304		

Aceite Eugenol (0,12% V/V)

Residual Error (0,12% V/V)					
VARIABLE	COEFICIENTE		STD error	T	P
c	3,3803		0,1399	24,1549	0,0001
b	1,2571		0,2147	5,8565	0,0006
m	8,3949		0,1086	77,3356	0,0001
y0	3,7842		0,0786	48,1149	0,0001
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	24,5262	8,1754	263,8617	0,0001
RESIDUAL	7	0,2169	0,031		
TOTAL	10	24,7431	2,4743		

A. Láctico (0,87% V/V)

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P		
c	4,0026	0,277	14,4478	<0,0001		
b	0,4441	0,0779	5,698	0,0007		
m	5,2253	0,3263	16,0161	<0,0001		
y0	3,9965	0,1656	24,1317	<0,0001		
ANALISIS DE VARIANZA						
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS		CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	25,599		8,533	154,2471	<0,0001
RESIDUAL	7	0,3872		0,0553		
TOTAL	10	25,9863		2,5986		

Romero - Orégano (0,06/0,06 %V/V)

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P		
c	4,1149	0,4832	8,5165	0,0004		
b	0,4543	0,093	4,8845	0,0045		
m	3,8151	0,2715	14,0497	<0,0001		
y0	3,1838	0,247	12,8878	<0,0001		
ANALISIS DE VARIANZA						
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS		CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESIÓN	3	14,9571		4,9857	242,2373	<0,0001
RESIDUAL	5	0,1029		0,0206		
TOTAL	8	15,06		1,8825		

Láctico - Orégano (0,02%/0,03% V/V)

Efectos Principales (0,027070,05707177)					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	3,5829	0,1813	19,7628	<0,0001	
b	0,3884	0,0452	8,6007	<0,0001	
m	4,3394	0,2392	18,138	<0,0001	
y0	2,9435	0,1157	25,4374	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	18,2011	6,067	379,2372	<0,0001
RESIDUAL	7	0,112	0,016		
TOTAL	10	18,3131	1,8313		

Control

Control					
VARIABLE	COEFICIENTE		STD error	T	P
c	6,4902		1,0205	6,3599	0,0004
b	0,2506		0,0678	3,6962	0,0077
m	6,337		0,6533	9,7005	<0,0001
y0	3,975		0,3418	11,6298	<0,0001
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	44,8095	14,9365	132,0923	<0,0001
RESIDUAL	7	0,7915	0,1131		
TOTAL	10	45,601	4,5601		

Tabla 2a. Recuento de Coliformes en el músculo con adición de todos los compuestos antimicrobianos en estudio,

Comparación multiple. (Fisher LSD Method):

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD	STD. error	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO (0,12% V/V)	2,936	0,79	0,238	0,531	AB
ORÉGANO (0,12% V/V)	2,818	0,402	0,121	0,27	A
EUGENOL (0,12% V/V)	3,94	0,669	0,202	0,449	CD
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	4,585	1,279	0,386	0,859	DE
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 %V/V)	3,105	0,57	0,172	0,383	ABC
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	3,701	1,187	0,358	0,797	BC
CONTROL	4,991	1,534	0,463	1,031	E
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	6	46,39	7,73	7,78	<0,0001
TRATAMIENTO	6	46,39	7,76	7,78	<0,0001
ERROR	70	69,56	0,99		
TOTAL	76	115,95			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tabla 2b. Análisis de varianza para la Ecuación Gompertz (recuento de coliformes):

Aceite de Romero (0,12% V/V):

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	1,973	0,1128	17,4909	<0,0001	
b	1,0241	0,1909	5,3651	0,003	
m	3,864	0,1472	26,2586	<0,0001	
y0	2,1065	0,0753	27,9877	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	5,9975	1,9992	169,3087	<0,0001
RESIDUAL	5	0,059	0,0118		
TOTAL	8	6,0565	0,7571		

Aceite de Orégano (0,12% V/V):

Análisis de Regresión (0,12% V/V):					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
y0	2,3987	0,0186	128,8813	<0,0001	
a	- 0,0137	0,0033	- 4,106	0,0045	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	1	0,0141	0,0141	16,8596	0,0045
RESIDUAL	7	0,0059	0,0008		
TOTAL	8	0,02	0,0025		

Aceite Eugenol (0,12% V/V):

Resumen de la Regresión (0,12 % V/V):					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	1,996	0,1271	15,7065	<0,0001	
b	0,653	0,1069	6,1071	0,0017	
m	2,487	0,2257	11,0214	0,0001	
y0	1,9379	0,0896	21,629	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	4,6921	1,564	259,624	<0,0001
RESIDUAL	5	0,0301	0,006		
TOTAL	8	4,7222	0,5903		

A. Láctico (0,87% V/V):

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P		
c	3,5815	0,489	7,3247	0,0002		
b	0,3044	0,081	3,7557	0,0071		
m	6,8983	0,5667	12,1718	<0,0001		
y0	6,8983	0,5667	12,1718	<0,0001		
ANALISIS DE VARIANZA						
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS		CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	16,0321		5,344	113,6972	<0,0001
RESIDUAL	7	0,329		0,047		
TOTAL	10	16,3611		1,6361		

Romero - Orégano (0,06%/ 0,06% V/V):

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P		
c	2,9865	0,8686	3,4384	0,0185		
b	0,2723	0,0998	2,7288	0,0413		
m	3,8947	0,5992	6,5	0,0013		
y0	1,2506	0,4194	2,9817	0,0307		
ANALISIS DE VARIANZA						
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS		CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	4,0544		1,3515	300,6138	<0,0001
RESIDUAL	5	0,0225		0,0045		
TOTAL	8	4,0769		0,5096		

Láctico - Orégano (0,02%/0,03% V/V)

Estatística - Gregorio (0,002 %/0,005 % / 1 %)						
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P		
c	3,675	0,3915	9,3872	<0,0001		
b	0,2498	0,0448	5,5722	0,0008		
m	6,868	0,4455	15,4173	<0,0001		
y0	2,1916	0,1106	19,8139	<0,0001		
ANALISIS DE VARIANZA						
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS		CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	13,9763		4,6588	305,4001	<0,0001
RESIDUAL	7	0,1068		0,0153		
TOTAL	10	14,0831		1,4083		

Control:

Control					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	4,8773	1,4801	3,2954	0,0216	
b	0,3081	0,116	2,6549	0,0452	
m	5,8168	0,9933	5,8558	0,0021	
y0	2,9369	0,1682	17,4567	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	12,3363	4,1121	122,0629	<0,0001
RESIDUAL	5	0,1684	0,0337		
TOTAL	8	12,5048	1,5631		

Tabla 3a. Recuento de Psicrótrofos en el músculo con adición de todos los compuestos antimicrobianos en estudio.

Comparación múltiple (Fisher LSD Method):

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD. error	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO (0,12% V/V)	4,808	1,017	0,307	0,684	A
ORÉGANO (0,12% V/V)	4,248	0,552	0,166	0,371	A
EUGENOL (0,12% V/V)	4,973	1,377	0,415	0,925	A
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	6,291	1,846	0,556	1,24	B
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 % V/V)	5,347	1,651	0,498	1,109	AB
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	4,832	1,085	0,327	0,729	A
CONTROL	8,05	2,49	0,751	1,673	C
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	6	109,13	18,19	7,6	<0,0001
TRATAMIENTO	6	109,13	18,19	7,6	<0,0001
ERROR	70	167,45	2,39		
TOTAL	76	276,58			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 3b. Análisis de varianza para la Ecuación Gompertz (recuento de Psicrótrofos):

Aceite de Romero (0,12% V/V)

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	4,0657	1,4332	2,8368	0,0252	
b	0,1705	0,0816	2,0904	0,0749	
m	6,9389	1,2383	5,6036	0,0008	
y0	3,2955	0,3993	8,2523	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO S MEDIOS	F	P
REGRESION	3	10,1456	3,3819	115,1625	<0,0001
RESIDUAL	7	0,2056	0,0294		
TOTAL	10	10,3512	1,0351		

Aceite de Orégano (0,12% V/V)

Modelo de Regresión (3,12% y 1,1%)					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	1,4239	0,1253	11,368	<0,0001	
b	0,3981	0,0848	4,6969	0,0022	
m	4,5441	0,3953	11,4956	<0,0001	
y0	3,4617	0,077	44,9714	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	2,9884	0,9961	117,1527	<0,0001
RESIDUAL	7	0,0595	0,0085		
TOTAL	10	3,048	0,3048		

Aceite Eugenol (0,12% V/V):

Prueba t de Student (b,12% = 0,12%)					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	4,7863	1,0523	4,5485	0,0026	
b	0,2164	0,0724	2,9893	0,0202	
m	7,3919	0,9009	8,2055	<0,0001	
y0	3,2787	0,2318	14,1429	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	18,6157	6,2052	125,6542	<0,0001
RESIDUAL	7	0,3457	0,0494		
TOTAL	10	18.9614	1,8961		

A, Láctico (0,87% V/V):

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P		
c	4,9865	0,2	24,9321	<0,0001		
b	0,3571	0,0352	10,1481	<0,0001		
m	5,4443	0,1663	32,7417	<0,0001		
y0	3,723	0,0978	38,0553	<0,0001		
ANALISIS DE VARIANZA						
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS		CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	33,9481		11,316	708,403	<0,0001
RESIDUAL	7	0,1118		0,016		
TOTAL	10	34,0599		3,406		

Romero - Orégano (0,06%/0,06% V/V):

VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	5,1827	0,5993	8,6485	0,0003	
b	0,3671	0,0638	5,7569	0,0022	
m	3,9482	0,243	16,2493	<0,0001	
y0	2,8987	0,2837	10,2185	0,0002	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	18,6644	6,2215	548,5266	<0,0001
RESIDUAL	5	0,0567	0,0113		
TOTAL	8	18,7212	2,3401		

Láctico - Orégano (0,02%/0,03% V/V)

Electro - Oregano (0,52 %/0,52 %/1 %)					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	2,9374	0,3235	9,0795	<0,0001	
b	0,3454	0,0909	3,799	0,0067	
m	5,7123	0,4419	12,9264	<0,0001	
y0	3,378	0,1454	23,2369	<0,0001	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS	F	P
REGRESIÓN	3	11,5251	3,8417	104,5963	<0,0001
RESIDUAL	7	0,2571	0,0367		
TOTAL	10	11,7822	1,1782		

Control:

Condicion					
VARIABLE	COEFICIENTE	STD error	T	P	
c	6,6291	0,73	9,0808	0,0001	
b	0,4046	0,1013	3,994	0,0072	
m	3,85	0,4927	7,8143	0,0002	
y0	3,8844	0,4621	8,4054	0,0002	
ANALISIS DE VARIANZA					
MEDIDA	DF	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
REGRESION	3	54,2887	18,0962	98,9228	<0,0001
RESIDUAL	6	1,0976	0,1829		
TOTAL	9	55,3863	6,154		

Anexo 2.

Tablas de resultados estadísticos del desarrollo de los diferentes grupos de microorganismos en las condiciones de estudio (SigmaPlot 11,0), Comparación entre tratamientos antimicrobianos,

Tabla 1 Análisis de varianza para el recuento de Aerobios Mesófilos en el músculo con adición de compuestos antimicrobianos de forma individual:

Comparación multiple (Fisher LSD Method):

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD. error	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO (0,12% V/V)	4,383	0,895	0,27	0,601	AB
ORÉGANO (0,12% V/V)	3,376	0,174	0,0525	0,117	A
EUGENOL (0,12%V/V)	5,215	1,573	0,474	1,057	BC
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	6,123	1,615	0,487	1,085	CD
CONTROL	6,622	1,534	0,463	1,031	D
ANALISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	4	75,36	18,84	11,39	<0,0001
TRATAMIENTO	4	75,36	18,84	11,39	<0,0001
ERROR	50	82,68	1,65		
TOTAL	54	158,04			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 2. Análisis de varianza para el recuento de Coliformes en el músculo con adición de compuestos antimicrobianos de forma individual:

Comparación multiple (Fisher LSD Method):

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD ERROR	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO (0,12% V/V)	2,936	0,79	0,238	0,531	A
ORÉGANO (0,12% V/V)	2,818	0,402	0,121	0,27	A
EUGENOL (0,12% V/V)	3,94	0,669	0,202	0,449	B
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	4,585	1,279	0,386	0,859	BC
CONTROL	4,991	1,534	0,463	1,031	C
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	4	41,23	10,31	9,87	<0,0001
TRATAMIENTO	4	31,23	10,31	9,87	<0,0001
ERROR	50	52,23	1,04		
TOTAL	54	93,46			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 3. Análisis de varianza para el recuento de Psicrótrofos en el músculo con adición de compuestos antimicrobianos de forma individual:

Comparación multiple (Fisher LSD Method):

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD ERROR	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO (0,12% V/V)	4,808	1,017	0,307	0,684	A
ORÉGANO (0,12% V/V)	4,248	0,552	0,166	0,371	A
EUGENOL (0,12%V/V)	4,973	1,377	0,415	0,925	AB
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	6,291	1,846	0,556	1,24	B
CONTROL	8,05	2,49	0,751	1,673	C
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	4	102,3	25,58	9,96	<0,0001
TRATAMIENTO	4	102,3	25,58	9,96	<0,0001
ERROR	50	128,41	2,57		
TOTAL	54	230,71			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 4. Análisis de varianza para el recuento de Aerobios Mesófilos en el músculo con adición de mezclas de antimicrobianos:

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD.error	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 % V/V)	5,226	1,474	0,444	0,99	A
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	5,006	1,353	0,408	0,909	A
CONTROL	6,622	1,534	0,463	1,031	B
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	2	16,89	8,44	3,98	0,0029
TRATAMIENTO	2	16,89	8,44	3,97	0,0029
ERROR	30	63,58	2,12		
TOTAL	32	80,47			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 5. Análisis de varianza para el recuento de coliformes en el músculo con adición de mezclas de antimicrobianos:

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD. error	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 % V/V)	4,991	1,534	0,463	1,031	A
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	3,701	1,187	0,358	0,797	A
CONTROL	3,105	0,57	0,172	0,383	B
ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	2	20,45	10,23	7,51	0,0023
TRATAMIENTO	2	20,45	10,23	7,51	0,0023
ERROR	30	40,87	1,36		
TOTAL	32	61,33			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 6. Análisis de varianza para el recuento de Psicrótrofos en el músculo con adición de mezclas de antimicrobianos:

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD. error	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 % V/V)	5,347	1,651	0,498	1,109	A
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	4,832	1,085	0,327	0,729	A
CONTROL	8,05	2,49	0,751	1,673	B
ANALISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	2	65,73	32,87	9,76	0,0005
TRATAMIENTO	2	65,73	32,87	9,76	0,0005
ERROR	30	101,03	3,37		
TOTAL	32	166,76			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla7. Análisis de varianza para el parámetro a* en el músculo con adición antimicrobianos

TRATAMIENTO	MEDIA	DESVIACIÓN STD.	STD. ERROR	INTERVALO CONFIANZA DE LA MEDIA	COMPARACIÓN
ROMERO (0,12% V/V)	14,04	2,456	0,741	1,65	CD
ORÉGANO (0,12% V/V)	14,75	3,134	0,945	2,105	D
EUGENOL (0,12% V/V)	13,79	2,008	0,605	1,349	CD
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	11,88	4,173	1,258	2,803	BC
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 %V/V)	10,38	3,017	0,91	2,027	AB
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	14,73	2,841	0,857	1,909	CD
CONTROL	8,49	4,912	1,481	3,3	A

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	DF	SUMA CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
MODELO	6	304,67	64,11	5,71	<0,0001
TRATAMIENTO	6	304,67	64,11	5,71	<0,0001
ERROR	70	786,04	11,27		
TOTAL	76	1170,71			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 8. Análisis de varianza correspondiente al factor color del análisis sensorial

GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA	COMPARACIÓN
EUGENOL (0,12% V/V)	20	130	6,5	1,94	ABC
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	20	151	7,55	4,05	BC
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 % V/V) (0,12% V/V)	20	126	6,3	5,06	A
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	20	127	6,35	6,13	ABC
CONTROL	20	152	7,6	2,56	C
ORÉGANO (0,12% V/V)	20	132	6,6	3,2	ABC
ROMERO (0,12% V/V)	20	131	6,55	4,57	ABC
ANÁLISIS DE VARIANZA					
VARIACIONES	SUMA CUADRADOS	DF	CUADRADOS MEDIOS	F	P
Entre grupos	36,88	6	6,14	1,56	0,162
Dentro de los grupos	523,25	133	3,93		
Total	560,13	139			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 9. Análisis de varianza correspondiente al factor textura del análisis sensorial

GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA	COMPARACIÓN
EUGENOL (0,12% V/V)	20	110	5,5	5,42	A
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	20	144	7,2	3,85	BC
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 %V/V) (0,12%V/V)	20	114	5,7	7,8	AB
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	20	125	6,25	6,82	ABC
CONTROL	20	148	7,4	5,2	C
ORÉGANO (0,12% V/V)	20	104	5,2	7,11	A
ROMERO (0,12% V/V)	20	116	5,8	6,90	AB

ANÁLISIS DE VARIANZA					
VARIACIONES	SUMA CUADRADOS	DF	CUADRADOS MEDIOS	F	P
Entre grupos	86,5	6	14,41	2,34	0,035
Dentro de los grupos	819,35	133	6,16		
Total	905,85	139			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Tabla 10. Análisis de varianza correspondiente al factor sabor del análisis sensorial

GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA	COMPARACIÓN
EUGENOL (0,12% V/V)	20	80	4	5,57	A
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	20	143	7,15	7,18	B
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 %V/V) (0,12%V/V)	20	87	4,35	7,08	A
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	20	129	6,45	5,83	B
CONTROL	20	154	7,7	4,11	B
ORÉGANO (0,12% V/V)	20	86	4,3	4,85	A
ROMERO (0,12% V/V)	20	60	3	4,84	A

ANÁLISIS DE VARIANZA					
VARIACIONES	SUMA CUADRADOS	DF	CUADRADOS MEDIOS	F	P
Entre grupos	387,68	6	64,61	11,45	<0,0001
Dentro de los grupos	750,45	133	5,64		
Total	1138,13	139			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 11. Análisis de varianza correspondiente a la aceptabilidad global en el análisis sensorial

GRUPOS	CUENTA	SUMA	PROMEDIO	VARIANZA	COMPARACIÓN
EUGENOL (0,12% V/V)	20	85	4,25	4,30	A
A. LÁCTICO (0,87% V/V)	20	138	6,9	5,67	B
ROMERO - ORÉGANO (0,06/0,06 %V/V) (0,12%V/V)	20	93	4,65	6,45	A
LÁCTICO - ORÉGANO (0,02%/0,03% V/V)	20	133	6,65	7,18	B
CONTROL	20	152	7,6	3,62	B
ORÉGANO (0,12% V/V)	20	99	4,95	5,20	A
ROMERO (0,12% V/V)	20	81	4,05	6,15	A
ANÁLISIS DE VARIANZA					
VARIACIONES	SUMA CUADRADOS	DF	CUADRADOS MEDIOS	F	P
Entre grupos	246,78	6	41,13	7,4594896	<0,0001
Dentro de los grupos	733,35	133	5,51		
Total	980,13	139			

Valores de Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)